Année scolaire
1956

THÈSE

N° 2

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Michel-Louis-René BENTZ

PHARMACIEN LIEUTENANT DES TROUPES COLONIALES
LICENCIÉ ÈS SCIENCES
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX
ANCIEN MONITEUR AU LABORATOIRE DE SÉROLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Bruxelles (Belgique), le 26 Février 1928.

1° — **Thèse :** CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DE « TREPONEMA PALLIDUM » SOUCHE REITER.

2° — QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ : LE TEST DE NELSON. SON INTERPRÉTATION.

Travail réalisé au Laboratoire d'Immunologie (Professeur R. PAUTRIZEL)
avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène (Professeur BUGNARD)
et de la Caisse Nationale de la Sécurité Sociale.

Soutenue le Jeudi 26 Juillet 1956 devant la Commission d'examen.

MM. R. PAUTRIZEL, professeur..... *Président*
G. MAYER, professeur..... } *Juges*
P. BLANQUET, professeur..... }

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1957

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0005

Année scolaire
1956

THÈSE

N° 2

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

Michel-Louis-René BENTZ

PHARMACIEN LIEUTENANT DES TROUPES COLONIALES
LICENCIÉ ÈS SCIENCES
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX
ANCIEN MONITEUR AU LABORATOIRE DE SÉROLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Bruxelles (Belgique). le 26 Février 1928.

1° — **Thèse :** CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DE « TREPONEMA PALLIDUM » SOUCHE REITER.

2° — QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ : LE TEST DE NELSON. SON INTERPRÉTATION.

Travail réalisé au Laboratoire d'Immunologie (Professeur R. PAUTRIZEL) avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène (Professeur BUGNARD) et de la Caisse Nationale de la Sécurité Sociale.

Soutenue le Jeudi 26 Juillet 1956 devant la Commission d'examen.

MM. R. PAUTRIZEL, professeur.. ..... *Président*
G. MAYER, professeur. .. .. . } *Juges*
P. BLANQUET, professeur.... ..... }

R. UNIV BIBLIOTHEEK LEIDEN

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1957

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.

DOYEN : M. SIGALAS. — ASSESSEUR : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, BEAUVIEUX, CREYX, MAURIAC BONNIN GOLSE.

PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.	
G. PORTMANN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie
F. PAPIN	Clinique chirurgicale
R. SIGALAS	Zoologie et parasitologie
E. AUBERTIN	Clinique médicale et des maladies infectieuses
X. J. DUBECQ	Clinique odonto-stomatologique
G. VITTE	Pharmacie
R. FABRE	Physiologie
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales
C. JOULIA	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
M. RIVIERE	Clinique d'accouchements
R. DE GRAILLY	Clinique médicale
R. DARGET	Clinique des maladies des voies urinaires
P. DERVILLEE	Médecine légale et médecine du travail
A. FONTAN	Clinique médicale des maladies des enfants
F. PIECHAUD	Hygiène et Clinique de la tuberculose
C. PIFFAULT	Physique médicale et pharmaceutique
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée
J. REBOUL	Electroradiologie et clinique d'électricité médicale
L. MASSE	Clinique chirurgicale
R. GIRARD	Botanique et cryptogamie

MM.	
P. MESNARD	Chimie
R. DUFOUR	Anatomie
P. BROUSTET	Clinique médicale
J. MAGENDIE	Clinique gynécologique
F. TAYEAU	Chimie biologique et médicale
G. MAYER	Anatomie générale et histologie
P. BLANQUET	Physique pharmaceutique (T. P.)
R. SARIC	Pathologie générale et expérimentale
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
J.-J. DUBARRY	Hydrologie thérapeutique et climatologie
F.-J TRAISSAC	Thérapeutique
R. PAUTRIZEL	Immunologie (T. P.)
G. MOUSTARDIER	Bactériologie
A. LACHAPELE	Carcinologie
P. CAZAUX	Hydrologie pharmaceutique (T. P.)
E. BESSIERE	Clinique ophtalmologique
H. LEGER	Anatomie pathologique et microscopie clinique
J. MASQUELIER	Matière médicale
G. MORETTI	Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

M. MAHON (Obstétrique), Mlle ROUGIER (Physiologie), M. DESPONS (Oto-rhino-laryngologie), M. LAUMONIER (Médecine opératoire).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM.	
R. GOLSE	Pharmacie (1re Section)
F. RIGAUD	Anatomie
E. NEUZIL	Biochimie médicale
J. FAURE	Pathologie expérimentale

MM.	
R. QUILICHINI	Pharmacie (2e Section)
R. STOLL	Histologie
H. CABANIE	Anatomie
J. DUHAMEL	Physique médicale
P. ROMAIN	Pharmacie (1re Section)

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM. J. MARQUEVIELLE (Biochimie médicale); J. BIRABEN (Anatomie pathologique)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
P. LE COULANT	Dermatologie et syphiligraphie
M. BERGOUIGNAN	Médecine générale
J. LENG-LEVY	Médecine générale
J. CHAVANNAZ	Chirurgie générale
P. VERGER	Pédiatrie et puériculture
J. LANGE	Urologie
L. CHASTRUSSE	Obstétrique
P. L'EPEE	Médecine légale et médecine du travail
J. VILLAR	Chirurgie générale
R. TINGAUD	Chirurgie générale
J. DEPAULIS	Chirurgie générale

MM.	
P. LAVIGNOLLE	Médecine générale
G. FAUGERE	Obstétrique
P. BENOIT	Odonto-stomatologie
C. MARTIN-DUPONT	Médecine générale
J. DAVID-CHAUSSE	Médecine générale
J. RIVIERE	Médecine générale
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale
L. CORCELLE	Ophtalmologie
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie
P. FREOUR	Pneumo-phtisiologie
M. BLANC	Neurologie et psychiatrie

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Obstétricie sociale	MAHON
Médecine opératoire	LAUMONIER
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Accouchements	CHASTRUSSE, FAUGERE
Puériculture	VERGER, PERY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Organographie et physiologie végétale	TEMPERE
Chimie biologique analytique	NIVET
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	VILLAR, CHAVANNAZ, TINGAUD, LAPORTE

	MM
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	Mme LINQUETTE
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'EPEE
Séméiologie médicale	J. RIVIÈRE
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLL
Bactériologie	DULONG DE ROSNAY
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN, LENG-LEVY, LAVIGNOLLE

Le Secrétaire principal de la Faculté : André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BLANQUET

PROFESSEUR DE PHYSIQUE PHARMACEUTIQUE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. MAYER

PROFESSEUR D'ANATOMIE GÉNÉRALE ET HISTOLOGIE

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

PROFESSEUR D'IMMUNOLOGIE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

CROIX DE GUERRE 1939-1945

CHEVALIER DES PALMES ACADÉMIQUES

PRÉFACE

Au moment où nous présentons le résultat de nos travaux à la veille de partir pour la France d'Outre-Mer, nous avons l'impérieux et très agréable devoir de remercier tous ceux qui, durant six années, ont contribué à notre formation scientifique et professionnelle à l'Ecole de Santé Navale, à la Faculté des Sciences, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie et dans les Hôpitaux.

Nous remercions tout d'abord MM. les Professeurs de l'Ecole de Santé Navale qui nous ont aidé de leurs leçons, de leurs conseils, de leurs directives. Grâce à l'Enseignement qu'ils nous ont donné, nous avons été placé dans de très bonnes conditions pour suivre avec fruit les cours de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté des Sciences.

A la Faculté des Sciences, MM. les Professeurs Colas, Pacault et Génevois ont amplifié nos connaissances en chimie organique, en chimie physique et en chimie analytique. MM. les Professeurs Combier et Weil, comme d'ailleurs M. le Professeur Fayeton, de la Faculté de Pharmacie, nous ont donné et développé, en Biologie, le goût de la recherche; ils ont eu une forte influence sur notre orientation scientifique. Nous leur devons toute notre gratitude.

Nous devons des remerciements à tous nos Professeurs de la Faculté de Pharmacie. Ils ont puissamment contribué non seulement à notre formation scientifique, mais encore à notre formation professionnelle. Ils nous ont permis, dès la fin de notre première année de Pharmacie, de suivre également les cours de la Faculté des Sciences et d'approfon-

avec succès, à la fin de notre deuxième année, le concours de l'Internat des Hôpitaux.

Dans les Hôpitaux, nous avons bénéficié du savoir, des conseils, de la bienveillance de M^lle^ Bègue. Nous la prions d'agréer, avec nos vifs remerciements, l'expression de nos très respectueux hommages.

Au Laboratoire de Parasitologie, nous avons profité de l'expérience de M. Bailenger. Il fut pour nous un guide expérimenté.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à tous nos camarades du Laboratoire de Sérologie qui n'ont jamais hésité à nous consacrer très aimablement une partie de leur précieux temps.

Nos recherches ont été facilitées par l'aide précieuse que nous ont apportée MM. les Professeurs Blanquet, Mayer et leurs collaborateurs. M. le Professeur Blanquet nous a montré la valeur des interprétations physico-chimiques de phénomènes bactériologiques, leur sensibilité et aussi leurs embûches. M. le Professeur Mayer nous a ouvert toutes grandes les portes de son Laboratoire et a mis à notre disposition un matériel qui nous a permis d'étayer notre travail de microphotographies. A tous nous disons merci.

Notre travail, nous n'avons pu l'accomplir que par l'action continue de notre Président. M. le Professeur Pautrizel nous a conseillé, guidé, éclairé avec une compétence, un doigté seulement égalés par une simplicité charmante et un dévouement sans limite. M. Pautrizel a eu une influence déterminante sur la tendance, sur la formation de notre esprit, il a excité en nous l'amour de la recherche et, nous osons le dire, il a provoqué l'enthousiasme qui nous a accompagné dans nos travaux. Nous adressons à M. le Professeur Pautrizel l'expression de notre immense gratitude et de notre très sincère et très cordial attachement.

Nous n'avons garde d'oublier notre Doyen, M. le Professeur Sigalas. Nous avons contracté envers lui une dette énorme. C'est M. Sigalas qui, au début de notre deuxième

année d'études, nous a admis au Laboratoire de Parasitologie; c'est lui qui nous a confié à M. Pautrizel.

Durant cinq années, M. le Professeur Sigalas s'est intéressé à nos travaux, durant cinq années il nous a prodigué conseils et encouragements; son aimable sollicitude, sa très grande bienveillance, sa bonté ont été pour nous un stimulant et un réconfort. Nous prions M. le Doyen Sigalas d accepter, avec nos très vifs et très sincères remerciements, l'expression de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DE « TREPONEMA PALLIDUM » SOUCHE REITER

INTRODUCTION

Depuis le début du siècle, de très nombreuses études ont été réalisées sur la syphilis, sur sa détection immunologique, sur son agent pathogène.

L'étude des caractères biologiques de cet agent pathogène a été menée de front avec celle des réactions sérologiques. Mais l'agent infectieux pathogène n'a jamais pu être obtenu en culture pure, bien que de nombreuses souches de tréponèmes aient été isolées de lésions syphilitiques. Ces souches se rapprochent du véritable tréponème pathogène, et des études très diverses portent sur ces organismes *in vitro*. Simultanément, le tréponème pâle virulent fut étudié *in vivo*.

Que ce soit sur l'animal ou en culture, la présence d'un polymorphisme du spirochète a toujours été constatée. C'est pourquoi, l'idée d'un cycle est très ancienne. Cependant, la preuve formelle n'a pas encore été donnée.

Le travail que nous apportons est une contribution à l'étude biologique d'un tréponème pâle, isolé par Wassermann et Ficker en 1922 : *Treponema pallidum* souche Reiter.

Cependant, l'ensemble des spirochètes présentant des formes atypiques voisines, il semble que l'on puisse étendre les constatations faites sur ce cas précis.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE DES TRAVAUX

Les spirochètes sont des micro-organismes monocellulaires, dont le corps est allongé et cylindrique, enroulé en spires. Leur longueur, leur largeur, le nombre et la régularité des spires sont des critères morphologiques permettant leur classification individuelle.

Leur classification générale s'est toujours révélée délicate. La dernière, à notre connaissance, est celle de Bergey, modifiée par Babudieri [1], qui s'est aidé du microscope électronique pour la détection des flagelles.

TREPONEMA PALLIDUM

C'est Schaudinn [55] qui découvrit le premier, en 1905, l'agent pathogène de la syphilis. Dès cette découverte, il émet l'hypothèse d'un cycle évolutif [56]. Pour lui, la phase de latence est caractérisée par la présence de formes granulaires : c'est « la phase de repos » *(Ruhestadium),* comme pour le spirochète de la fièvre récurrente.

Prowazeck, en 1907, adhérait aussi à l'idée d'un *Ruhestadium,* caractérisé par ces formes.

Il était alors difficile de confirmer de façon précise ces hypothèses, car les méthodes employées pour la détection apportaient trop d'artefacts de toutes sortes.

Cependant, un grand nombre de formes diverses ont été décrites : anneaux, boucles, corps allongés, arrondis, « corps ramolli » (?) de Krzystalowicz [32], bâton, baguette, etc.

L'idée de Schaudinn fut plus ou moins abandonnée, car presque tous les auteurs ont considéré ces formes comme l'expression d'une « dégénérescence » des spirochètes typiques. En effet, ils les rencontraient surtout dans les lésions anciennes, dans la syphilis tertiaire.

L'idée d'une phase préspirochétienne granulaire restait quand même vivante.

En 1927, Levaditi [35] en parle : il existe une phase préspirochétienne capable de reproduire la phase tréponémique, stade végétatif. Cela expliquerait les cas de syphilis inapparente, en particulier chez le Lapin (ganglions poplités et inguinaux) et surtout chez les rats les souris (travaux de Truffi en 1913, de Nicolle en 1919, surtout ceux de Levaditi de 1927 à 1934, cités par Mollinedo y Herrera [44]).

Mais Levaditi donne à cē premier stade une valeur d'infravirus, par conséquent invisible, « ultra-microscopique ». De plus, il leur attribue la valeur d'un processus involutif.

En 1931, Lépine émet une autre théorie [33, 34], il y aurait deux formes :

— Une forme granulaire,

— Une forme spirochétienne,

et la « virulence serait le fait exclusif de la forme infravisible du virus, à la fois infectante et résistante, la phase tréponémique étant simplement une forme saprophyte, rappel d'une forme ancestrale, prise par le virus, pullulant au sein des lésions ».

Ces hypothèses furent vivement critiquées, et les travaux ultérieurs, notamment de Manouelian [36, 37, 38], Seguin [57], Mollinedo y Herrera [44], portèrent plus particulièrement sur le granule, dit « spirochétogène », sur sa

morphologie aux techniques d'imprégnation argentique, sur sa filtrabilité, sur sa signification biologique en général; c'est un élément vivant, apparaissant dans des conditions déterminées. Mais il faut insister sur le fait que ces granules ont été mis en évidence dans des lésions anciennes, chez des malades ou des animaux traités. Si bien que la conclusion des auteurs est logique : ce sont des formes de « dégénérescence » pour les uns, de « résistance » pour les autres, dont la production apparaît après le développement spiralé à division homotypique.

Ainsi Mollinedo y Herrera [44], après une étude approfondie de tous les travaux effectués et de toutes les hypothèses émises avant 1941, conclut : « Le granule spirochétogène paraît être non seulement une forme qui fait partie du cycle évolutif, mais aussi une forme de résistance. Par analogie avec d'autres spirochètes, il nous est permis de penser que le granule spirochétogène du *Treponema pallidum* est filtrable et qu'il constitue un aspect morphologique du parasite. Comme dans les cultures de spirochètes, on doit observer, au cours des divers stades de la syphilis : divisions homotypiques puis divisions hétérotypiques pour arriver à la formation du granule spirochétogène ».

TRÉPONÈME PALE EN CULTURE

De très nombreux essais d'isolement en culture ont été faits depuis la découverte de Schaudinn. Les diverses souches isolées, cultivables, se sont toujours montrées avirulentes. Pouvait-on, dans ces conditions, leur attribuer le nom de *Treponema pallidum* ? Les caractères morphologiques semblaient l'affirmer. Aussi, on dénomme ces souches : *Treponema pallidum* souche...

Noguchi, en 1912 [47], isola la première souche et en étudia la structure antigénique. Quelques années plus tard, en 1922, Wassermann et Ficker isolèrent une souche qui porta le nom de Ficker.

Puis, selon Muster [46], elle passa entre les mains de Reiter qui lui donna son nom, et « devint la propriété de l'Institut sérothérapique de Saxe » qui la cultivait sur un milieu, dont la formule resta secrète.

Gaethgens [28] pensait que le « palligène » — suspension de la souche Reiter en eau physiologique phéniquée — ne correspondait pas au vrai tréponème pâle, mais en était très voisin.

Koch [31], puis Eagle [21] pensaient de même, car ses caractères antigéniques sont très proches de celles du tréponème pâle.

C'est pourquoi l'étude de la souche Reiter a été entreprise sur deux plans : *immunologique* et *biologique* (en particulier biochimique).

Comme dans le cas du tréponème pâle *in vivo,* la culture posa très vite aussi le problème d'un cycle. Les formes atypiques sont assimilables à toutes celles du tréponème pâle et se rencontrent d'une façon générale dans les cultures âgées.

Ce sont les Américains qui ont particulièrement approfondi la biochimie de la souche Reiter.

MORPHOLOGIE DU *TREPONEMA PALLIDUM* SOUCHE REITER

En 1949, Gelperin [29] compare la souche Reiter et le tréponème pathogène. Il note la possibilité d'un cycle évolutif en fin de culture. En 1951, Rose [52], à l'aide du microscope électronique, après ombrage, met en valeur la présence de flagelles, que possède également l'agent virulent. Il donne, quelques mois plus tard [53], certaines photographies de formes aberrantes. Il parle, lui aussi, d'un cycle.

Signalons que Moureau [45], en 1956, pense pouvoir homologuer le *Treponema pallidum* souche Reiter au *Treponema refringens,* qu'il décrit.

La souche que nous avons entretenue présentait les caractères suivants au microscope à contraste de phase :

Longueur : variable en fonction de l'âge de la culture (long ou très long en début, 15 à 30 μ, le plus souvent il s'agit de plusieurs spirochètes non encore séparés), la longueur se régularise en fin de phase logarithmique : 10 μ environ.

Largeur : variable également (très fin au début des cultures; diamètre d'environ 0,2 à 0,3 μ; cette largeur est constante sur l'ensemble du corps). Mais dès la fin du développement logarithmique, les spirochètes s'épaississent.

Axe-spire : l'axe des spires est droit dans la partie médiane, mais à chaque extrémité il s'infléchit suivant un angle de 60° environ. Ce caractère n'est pas étendu à tous les spirochètes présents, mais en marque le plus grand nombre. Les spires sont également fonction de l'âge de la culture. Peu marquées, ou même absentes au début, elles sont plus nettes à la fin du développement logarithmique ou dans les cultures à développement lent. Nombre de spires : 6 à 8, très régulières.

Cycle évolutif :

En 1948, Eagle et Germuth [22] remarquent un fort pourcentage d'éléments globulaires dans les vieilles cultures, et posent l'hypothèse soit d'un cycle évolutif, soit de formes dégénérées.

En 1949, Gelperin [29] essayait de faire le point de la question en décrivant un ensemble de formes qui devaient dépendre les unes des autres. « Ces formes représentent un enkystement des organismes, lorsque la propagation devient difficile. Il note qu'après repiquage de formes rondes, on retrouve, après vingt-quatre heures, des spirochètes granuleux *agglomérés* ou *isolés*.

Il a pu remarquer certaines formes rondes se « dévidant » dans le milieu par un pôle de cette sphère.

Le calcul lui a permis d'affirmer que les spirochètes obtenus par repiquage proviennent bien de ces formes rondes, plutôt que des spirochètes initiaux très peu mobiles.

Etudiant l'effet de la dilution de l'inoculum sur le développement, il remarque que, si le nombre total obtenu reste le même, la phase logarithmique est prolongée. Nous avons refait ces expériences pour connaître la réponse des spirochètes à ce facteur dilution, car l'étude de cet auteur n'a porté que sur des cultures âgées déjà de deux jours, ce qui nous sembla toujours tardif. Et de plus, son procédé de numération par Kjendallisation ou turbidimétrie ne tient pas entièrement compte de la biologie de l'organisme.

En 1950, de Lamater et Haanes [12 à 20] entreprirent une nouvelle série de travaux sur la morphologie de diverses souches de tréponème pâle et, employant les procédés les plus modernes d'examen microscopique, de nombreuses photographies furent publiées (souches Nichols, Kazan, Reiter), au microscope à contraste de phase et au microscope électronique qui, sans déterminer exactement les processus de transformations en formes rondes, n'en montrent pas moins que ce phénomène est assez général et apparaît dans les cultures âgées sous forme de « bourgeons » ou de « kystes » présentant des granulations internes ou des filaments spirochétiens qui leur restent attachés. Les expériences de filtration sont restées négatives.

En 1952, Rose et Morton entreprennent une étude d'aspect plus biologique, afin de déterminer certains facteurs de variations morphologiques. Ils simplifient les descriptions des auteurs en présentant trois formes atypiques :

— Les formes en anneaux;
— Les corps ronds *(Round Body);*
— Les granules;

mais ils n'insistent pas sur les relations qui existent entre elles.

Pour les *formes en anneaux*, plusieurs facteurs sont mis en valeur :

— La fréquence du repiquage : *diminution* du pourcentage proportionnel à cette fréquence;

— Le changement de milieu : *augmentation* du pourcentage au premier repiquage. Il y a également une relation entre ce pourcentage et la valeur du milieu : agar, cystéine, thioglycollate, etc.

— L'incubation à 24°;

— L'aérobiose;

— Le repiquage sur de vieux milieux filtrés;

— Les déséquilibres osmotiques, notamment par passage en milieux hypo ou hypertoniques;

— Le séjour en préparation lutée.

Ces formes auraient une faible « vitalité » au repiquage.

Pour les *corps ronds* et les *granules*, les facteurs qui les produisent seraient voisins. Leur « vitalité » est faible, sinon nulle, et leur isolement au micromanipulateur n'a jamais donné de spirochètes dans des milieux neufs.

En conclusion, les auteurs ne pensent pas que « cette apparence de cycle est un vrai cycle vital », mais que les tréponèmes sont hautement polymorphiques.

Certes, les travaux de Rose et de Morton sont particulièrement intéressants, car ils indiquent quelques conditions dont il faut toujours tenir compte quand on étudie les spirochètes. En quelques minutes, leur forme peut varier. En une heure, en sérum physiologique, on ne retrouve pratiquement plus de forme typique. En additionnant une quantité insuffisante d'acide phénique à un milieu, les tréponèmes ne sont pas tués sur le coup, car cet acide n'a précipité que les protéines du milieu. En quelques heures, les formes spiralées sont transformées en granules.

Mais, là encore, les auteurs n'ont pas étudié des cultures suffisamment jeunes. En deux jours, beaucoup de choses se produisent dans une culture, si le développement est rapide. Nous avons rencontré des variations identiques à

celles décrites par Rose et Morton, mais nous verrons que ces variations morphologiques n'ont pas toujours la même signification et, surtout, ne correspondent pas forcément au même stade de développement.

D'autres travaux méritent d'être signalés, notamment ceux de Eagle et Steinman [23 à 27]. Ils ont trait aux besoins nutritifs du tréponème de Reiter et à quelques métabolismes.

L'action des divers composés chimiques est estimée :

— *Soit* par comptage d'organismes spiralés,

— *Soit* par turbidimétrie, après six jours, ce qui paraît insuffisant.

Pour les réducteurs, il note qu'un nombre maximum d'organismes spiralés est obtenu après six jours, avec une concentration en cystéine de 0,33 p. 100 par exemple. Mais elle agit à des concentrations inférieures. Nous verrons qu'elle agit aussi à des concentrations supérieures.

Comparée aux autres réducteurs soufrés, notamment l'acide thioglycollique, elle se montre plus active. Cela est-il dû à sa fonction acide aminée ?

L'acide acétique et le sérum :

Les auteurs montrent que, dialysé, ce dernier n'agit plus; que le principe actif, non dyalisable, est une albumine, la partie dialysable pouvant être remplacée par l'acide acétique.

Cherchant le mode d'action du sérum, ils ont pu montrer que les protéines ont deux propriétés :

— Détoxifiant des lipides,

— Facteur nutritif,

alors que les acides gras sont facteurs de croissance et toxiques.

Cet équilibre : protéine - lipide leur semble assez général; c'est ainsi que la sérum - albumine cristallisée (non délipidée) apporte et détoxifie en même temps un liquide essentiel. Déjà Dubos l'avait noté pour le bacille de Koch.

Cependant, il est dommage qu'une étude morphologique

plus approfondie n'ait été faite. Eagle et Steinman ont étudié un nombre important de facteurs chimiques et n'ont considéré que la réponse numérique après six jours. Cela leur a permis de constituer un milieu entièrement synthétique. Mais le problème biologique n'a pas été abordé.

Finalement, malgré les nombreuses et importantes études biochimiques entreprises sur le *Treponema pallidum* souche Reiter, la question du polymorphisme exprimant un cycle vital, n'est encore qu'une hypothèse, comme nous l'avons vu pour le tréponème pâle. et la signification et les liens qui existent entre les formes spiralées et les formes atypiques granulaires sont encore flous.

En est-il de même pour d'autres spirochètes ? Nous pouvons dire que ce polymorphisme est absolument général.

Mollinedo y Herrera [44] a fait une étude de tous les travaux effectués jusqu'en 1941, et on peut noter une grande similitude dans les observations. De cet ensemble extrêmement complet, nous pouvons mettre en valeur plusieurs travaux particulièrement intéressants.

En effet, si la plupart caractérisent les formes atypiques dans les vieilles lésions ou cultures, certains les ont rencontrées dans la phase jeune précédant la phase spiralée. C'est la « phase de latence », terme courant de la bactériologie classique.

Ainsi Prowazck, en 1907, sur les *T. Shaudinni, gallinarum, bucalis.*

Dutton et Todd, en 1907, aussi parlent d'un cycle pour le *Spirocheta duttoni,* chez *Ornithodorus moubata* infectée par la forme spiralée qui ne présente que des granules quelques heures après l'infection. Ces observations sont reprises par Leishman qui a décrit un véritable cycle prés-pirochétien dans le tube digestif de l'ornithodore. Notons aussi que ces formations sont intensément chromatiques. Mais il en est de même lors du passage hôte intermédiaire hôte définitif, comme Marchoux le montra en 1930 dans la spirillose des poules.

Il note que la transformation en forme spiralée s'opère avec une soudaineté comme explosive.

Des très nombreux travaux effectués, il ressort qu'un cycle doit exister et qu'il est dû :

— Soit à un passage d'un milieu à un autre,

— Soit à l'évolution d'un même milieu au cours de la culture.

Cependant, on est bien loin d'un accord de tous les chercheurs. Et si, le plus souvent, le polymorphisme spirochétien est admis, les explications données divergent, ainsi que la signification attribuée au phénomène.

C'est ainsi qu'en 1956, Moureau [45], étudiant la morphologie de certaines souches de tréponèmes anaérobies *(T. minutum, calligyra, refringens, phagedonis)*, dira de ces formes rondes : « Formes d'involution ? Formes de résistance ? Granules ?... Stade défini d'un cycle qui serait lui-même constant ou facultatif, selon les conditions biologiques ?...

« Il nous semble que toutes ces questions doivent rester sans réponses malgré une cinquantaine d'années de travaux et d'intéressantes tentatives, aussi longtemps que nous ne posséderons pas une technique permettant de suivre, cinématographiquement au moins, le développement complet d'un germe isolé, ou une technique cytochimique qui en donne la valeur exacte. »

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

La question d'un cycle réel est donc toujours posée. Il se dégage cependant :

— Que tous les spirochètes présentent un polymorphisme déconcertant;

— Que ce polymorphisme peut être lié aux variations du milieu;

— Que sa signification reste confuse : évolution, involution, résistance, cycle vital, etc.

Les nombreux travaux entrepris sur la constitution antigénique du *Treponema pallidum* souche Reiter nécessitaient une connaissance plus sûre de la biologie propre de ce micro-organisme. Aussi, nous sommes-nous attaché à suivre de très près la culture de ce spirochète, à partir du moment de l'ensemencement, en notant les variations caractéristiques que subissent les spirochètes. En effet, il nous est apparu que la période de culture la plus intéressante à suivre correspond aux deux premiers jours et même surtout aux dix premières heures, le reste du développement n'étant que le résultat des transformations obtenues lors de ces premières heures.

Reprenant l'hypothèse déjà ancienne du « polymorphisme expression d'un cycle », nous avons essayé de

dégager quelques faits pouvant marquer ce phénomène. C'est pourquoi nous nous sommes attaché à l'aspect biologique, ne faisant varier qu'un petit nombre de facteurs pouvant intéresser le spirochète et en suivant les cultures bien avant la phase d'expansion spirochétienne.

Cela nous a permis de rencontrer des formes dites « involutives » dans les cultures de cinq heures à deux jours, aussi bien que dans les cultures de quinze jours.

La question s'est donc posée de savoir ce que représentaient biologiquement ces formes caractéristiques. L'étude physicochimique a été entreprise, permettant de mettre en évidence le métabolisme des diverses formes. Leur valeur biologique au repiquage montrera l'importance de la qualité de l'inoculum, comparée à sa quantité.

Enfin, une ébauche d'étude cytochimique permettra de définir plus exactement ce que sont, en réalité, toutes les formes atypiques du *Treponema pallidum* souche Reiter. Ce travail a pour but de montrer :

— Qu'au cours du développement des cultures de *Treponema pallidum* souche Reiter, il se produit un véritable cycle consistant en un équilibre variable entre deux formes : granulaire et spiralée;

— Que ce cycle apparaît plus clairement si on suit les cultures aussitôt l'ensemencement sur un milieu neuf;

— Enfin, que chaque phase du cycle a une signification probablement très précise.

I. — MOYENS D'ANALYSE

A. — Microscopie

Les éléments spirochétiens vivants (7 à 10 μ/0,3 μ) ne se voyant pas au microscope ordinaire, on peut avoir recours :

— Soit au fond noir,

— Soit au microscope à contraste de phase,

— Soit au microscope électronique.

1° *Le fond noir,* utilisé notamment par Gelperin [29], est un bon procédé, mais à la seule condition de n'étudier que la phase spiralée. Les éléments granulaires, parfois très fins, s'ils sont visibles, ne sont que très difficilement identifiables. Il en est de même pour les éléments agglomérés. Leur structure, au fond noir, n'apparaît jamais nettement, or nous ne voulions pas négliger les formes atypiques. Force est donc de recourir à un autre procédé d'observation à l'état vivant.

2° *Le microscope à contraste de phase* permet de voir très nettement toutes les formes et donne une indication sur la nature et même la structure des éléments rencontrés. L'emploi de ce mode d'observation est extrêmement aisé, et on a pu suivre ainsi les souches. L'observation portant sur l'élément vivant, on n'a aucune déformation. Ainsi, nous pourrons comparer les colorations sur lames et l'observation des éléments vivants, l'une et l'autre se complètent. Mais c'est le microscope à contraste de phase qui donne les meilleurs renseignements. L'ensemble des travaux effectués ici a été fait à l'aide de ce procédé (microscope Zeiss-Opton).

Plusieurs études ont été publiées sur ce procédé, notamment de Delamater, Haanes et Wiggall [12].

3° *Le microscope électronique.* — Ce mode d'observation se révèle peu pratique. De plus, il offre deux inconvénients majeurs :

— D'une part, les éléments subissent une dessiccation sous vide intense, aussi les formes granulaires sont-elles déformées;

— D'autre part, le faisceau électronique ne perce pas l'organisme, donc ne donne pas plus de renseignements que le contraste de phase, sinon moins.

Cependant, dans de nombreux travaux on trouve des photographies faites au microscope électronique (Rose [53], Babudieri [1, 2], Moureau [45]), qui s'est montré parti-

culièrement intéressant pour l'étude du système flagellaire après ombrage. Nous avons obtenu, une fois seulement, un spirochète flagellé (sans ombrage). Sans doute le système flagellaire du spirochète est-il fragile. Mais nous ne nous sommes pas attaché spécialement à ce problème.

Le microscope électronique, doué d'un grand pouvoir séparateur, se révélera sans doute plus utile pour l'observation de formes soumises à des traitements par les nucléases ou autres enzymes.

B. — Coloration

Afin de confronter les constatations au contraste de phase avec les méthodes classiques d'observation des micro-organismes, nous nous sommes attaché à trouver un procédé de coloration des spirochètes respectant leur forme. Il fallait que ce procédé remplisse au moins trois conditions :

— Etre pratique et donner le moins possible d'artefacts;

— Respecter le polymorphisme constaté au contraste de phase;

— Dévoiler autant que possible la structure des différentes formes et exprimer, dans une certaine mesure, l'affinité chimique des éléments.

Les méthodes classiques d'examens sur lames sont, principalement : la méthode à l'encre de Chine, celle de Fontana ainsi que diverses techniques dérivées de cette dernière : la méthode de May - Grunwald - Giemsa, la coloration de Vago, etc.

Recherchant surtout les formes non spiralées et leur structure, nous avons éliminé rapidement la méthode à l'encre de Chine.

La méthode de Fontana, modifiée par Molinedo [44] puis par Delamater, Haans et Wiggall [13], ne permet pas un examen complet des formes. Elle apporte souvent des artefacts et l'on ne peut compter comme formes rondes

que ce qui possède un filament, tout autre élément rond ayant une origine plus ou moins douteuse. Les « granules spirochétogènes » se voient par contre très aisément et ne peuvent être mis en doute la plupart du temps. Mais la structure ne peut être analysée, ni l'affinité chimique. Il est donc difficile de comparer les préparations obtenues avec la microscopie à contraste de phase.

La méthode de Giemsa donne, par contre, des colorations plus intéressantes. La méthode classique n'apporte que peu d'artefacts, d'ailleurs faciles à reconnaître. L'affinité chimique recherchée est respectée. Mais les colorations sont pâles, aussi faut-il laisser agir le Giemsa pendant deux heures et plus. Ce procédé a le désavantage d'être donc très long pour un résultat relativement peu encourageant. Nous avons donc recherché d'autres méthodes.

La coloration de Vago au mercurochrome est intéressante pour des examens rapides sur culot de centrifugation, sans recherches de structure. Les colorations sont extrêmement nettes avec le mercurochrome en solution alcoolique. Une dilution au 1/10 dans l'eau atténue un peu le brillant des éléments sans enlever l'intensité à la coloration.

Coloration : une minute à froid, après fixation à l'alcool, lavage abondant à l'eau, séchage.

Cette méthode présente deux inconvénients :

— On ne peut l'employer avec des frottis de milieu, car on obtient un très grand nombre d'artefacts granulaires empêchant une bonne observation des spirochètes;

— D'autre part, nous n'avons pu l'utiliser en association avec d'autres colorants sans risquer des précipitations désastreuses.

Nous nous sommes alors tourné vers d'autres colorants classiques pouvant satisfaire les conditions que nous nous étions fixées.

C'est le bleu de toluidine phéniquée qui nous a donné toujours le plus de satisfaction, notamment dans les pre-

mières phases de cultures. Il est assez spécifique comme colorant basophile. Cependant, même pour des temps prolongés, les colorations restent peu intenses. Il faut lui associer une autre coloration susceptible d'accentuer l'intensité de la coloration de nos éléments, ou tout au moins de créer un contraste plus facile à interpréter, tout en conservant la spécificité du bleu de toluidine pour nos éléments.

Le violet de gentiane a été essayé, soit seul, soit avant, soit après coloration au bleu de toluidine.

Employé *seul,* la coloration est intense mais ne permet pas d'étudier les structures.

Employé *avant,* il est partiellement déplacé par le bleu, aussi les résultats sont-ils irréguliers, en particulier si on opère sur des frottis de milieu.

Employé *après,* il donne de très nombreuses taches parasites, rendant la méthode peu fidèle.

La fuschine diluée (Ziehl dilué au 1/20). — Elle s'est montrée très intéressante après coloration au bleu de toluidine. Le Ziehl dilué est un très bon colorant des spirochètes, mais ne donne pas de contraste suffisant entre les différents éléments basophiles des corps tréponémiques, en particulier pour les formes rondes ou granulaires.

Finalement, nous procédons de la manière suivante :

— Etalement;
— Dessiccation à l'étuve à 37°;
— Fixation à l'alcool, flambage;
— Coloration au bleu de toluidine phéniqué : R. A L.;
  — à chaud (40° environ sur platine chauffante) : cinq à six minutes;
  — à froid : trente minutes;
— Lavage;
— Ziehl dilué pendant trente secondes;
— Lavage, séchage.

L'intensité de coloration dépend de l'âge des cultures. Elle passe par un maximum au début des cultures. Les

spirochètes ne sont jamais colorés intensément, car ils sont très minces (0,2 à 0,3 μ). Les formes atypiques se colorent de façon variable, suivant l'âge. En fin de culture, il faut obligatoirement traiter à la fuschine.

C. — Numération

Etant donné le but de notre travail, nous ne pouvions utiliser les méthodes de numérations classiques en bactériologie, que certains auteurs ont employées pour travailler sur les spirochètes :

Turbidimétrie et dosage d'azote [29, 64 et 27];

Comptage au fond noir [29, 23, 24 et 25];

Méthodes des dilutions et d'ensemencement [53].

Aucune ne nous renseignait sur l'équilibre des formes en présence. Nous nous sommes résolu à faire des numérations directes, avec ou sans dilutions, au microscope à contraste de phase, dans des conditions aussi strictes et reproductibles que possible.

La première partie de notre travail a été effectuée avec le protocole de numération suivant :

Agitation du milieu pendant cinq minutes au moins, afin d'obtenir un prélèvement homogène. Contrôle au microscope à contraste de phase afin de déterminer les formes existantes, leur disposition naturelle, leur pourcentage approximatif et la dilution à apporter pour avoir un nombre d'éléments comptables aisément, tout en n'étant pas trop faible, 10 à 30 par champ.

Dilution avec du sérum physiologique phéniqué à 0,5 p. 100, qui conserve très bien les formes, pourtant fragiles. (La dilution est faite dans des pipettes à dilution pour globules blancs, 1/10... 1/20, ou globules rouges, 1/100... 1/200.)

Longue agitation afin de bien homogénéiser, c'est-à-dire dissocier le plus possible les amas spirochétiens très fréquents, surtout dans les cultures jeunes. A l'aide d'une

pipette étalonnée, une goutte de cette dilution est placée entre une lame propre, lavée à l'alcool et alcool-éther, et une lame plate pour hématimètre. La même pipette sert pour toutes les mesures, puis est lavée à l'eau, à l'alcool et à l'alcool-éther.

Le comptage est fait après cinq minutes de sédimentation, sur 10 champs au microscope à contraste de phase Zeiss-Opton (grossissement : 800 fois). L'étalonnage permet de rapporter tous les chiffres à 1/100 de mm^3.

Primitivement, l'ensemble des formes a été divisé en trois lots :

— Spiralés;

— Formes rondes, possédant un ou plusieurs filaments spirochétiens;

— Granules proprement dits.

Mais la grande variété des formes rend les numérations de ce genre très longues, d'où risque de dessiccation, de déplacements liquidiens, etc. Aussi, a-t-on, pour simplifier, différencié seulement :

— Formes atypiques, d'une part;

— Formes spiralées, d'autre part.

Nous verrons, d'ailleurs, que cette schématisation ne va pas tellement à l'encontre des faits. Malgré ces précautions, nos numérations n'ont pas été tout à fait homogènes. En effet, le protocole en est relativement simple, mais cette hétérogénéité tient, nous l'avons vite constaté, au mode de développement du *Treponema pallidum* souche Reiter; même en agitant très longtemps les cultures, on ne peut empêcher les numérations d'être parfois fortement entachées d'erreurs.

Tout en poursuivant cette méthode, nous avons essayé de définir un protocole beaucoup plus long, mais plus précis.

La culture est faite dans des tubes à centrifuger, coniques; au moment désiré, on centrifuge à 6.000 tours/minute pendant vingt-cinq minutes. Les contrôles des surnageats

ne montrent aucun élément spiralé et de rares granulations atypiques.

Reprise du culot par du sérum physiologique saturé en chloroforme ou phéniqué à 0,5 p. 100 et additionné de 1/3 de bleu de toluidine phéniqué R. A. L.; homogénéisation par agitation vive. Repos pendant une demi-heure.

Dilution, si c'est nécessaire, avec du sérum physiologique additionné de bleu de toluidine, de façon à avoir 300 éléments environ par 1/100 mm^3.

Comptage en cellule de Malassez après un quart d'heure à une demi-heure de repos pour décantation.

Dans ces conditions, les dilutions sont homogènes sans aucun amas. Des comptages en divers endroits ou un examen de l'ensemble permettent de le contrôler.

Remarque. — Si l'on a un microscope à contraste de phase, on peut se dispenser de reprendre par le sérum physiologique au bleu de toluidine phéniqué, mais le verre de la cellule de Malassez étant très épais, le contraste est évidemment moins bon qu'avec une lame ordinaire. En présence de bleu de toluidine phéniqué, le contraste est très amélioré et la lecture est, sinon facile, du moins plus aisée.

Pour la microscopie ordinaire, il faut évidemment toujours employer le bleu de toluidine phéniqué.

Par évaporation sur lame des reliquats on obtient des préparations témoins examinables à l'immersion après simple lavage, pour éliminer le chlorure de Na et l'excès de colorant.

II. — DÉVELOPPEMENT ET FORMES

Nous ne connaissons pas d'étude systématique sur le développement type d'une culture de *Treponema pallidum* souche Reiter, du moins en ce qui concerne les premiers stades. Par contre, tous les auteurs admettent un passage de la forme spiralée à la forme ronde dans les cultures

âgées. Ce phénomène est général, comme on a pu s'en rendre compte.

Rose et Morton [53] signalent, dans leur travail, que le passage dans un milieu nouveau, entraîne un pourcentage important de formes annulaires et rondes dans les cinq à huit jours; il en est de même au cours de repiquages espacés. Les repiquages réguliers n'en ont que 5 p. 100 environ après cinq jours de culture.

Il fallait donc, pour étudier le développement normal, créer une sorte de « souche-étalon », entretenue constamment le plus identique à elle-même. L'influence des autres facteurs pourra être ainsi comparée au développement type.

Signalons deux facteurs constants employés pour tous les milieux :

— Le sérum de lapin, dont Eagle et Steiman [23] ont fixé la concentration optima à 10 p. 100. On a employé du sérum de lapin frais, stérilisé par filtration. D'autres sérums peuvent être employés (humain, cheval en particulier). Ces divers sérums sont indispensables au développement par leur fraction albuminique.

— L'huile de paraffine stérile. Tous les milieux sont recouverts de 1 à 2 cm d'huile.

Nous pouvions utiliser deux milieux : milieu Brewer, milieu V. F. Institut Pasteur, mais la concentration optima en acide thioglycollique restait à fixer.

A. — Premiers repiquages

Partant d'une souche âgée conservée à 27° sur milieu Brewer, deux essais ont été faits : sur milieu Brewer et sur milieu V. F. additionné de thioglycollate de Na de 0,5 à 3 p. 1.000.

1° *Milieu Brewer :*

« *Bacto fluid thioglycollate medium dehydrated* »
(Difco Laboratoires, Detroit, Michigan)

a) *Composition* pour 1.000 cm³ d'eau distillée :

Extrait de caséine	15 » g
— de levure	5 » g
Dextrose	5 » g
ClNa	2,5 g
L. cystine	0,75 g
Acide thioglycollique	0,3 g
Agar	0,75 g
Résazurin	0,001 g

b) *Préparation :* 29,7 g de poudre sont dissous au bain-marie dans 1.000 ml d'eau distillée. Après répartition dans des tubes stériles contenant quatre petites billes de verre, on stérilise à l'autoclave pendant vingt minutes à 120°. Les milieux se conservent très bien à la glacière, mais il est conseillé cependant de les régénérer avant repiquage s'ils ont été préparés depuis plus de huit jours.

c) *Repiquage :* après régénération du milieu pendant trente minutes au bain-marie bouillant et refroidissement sous eau courante, on ajoute :

10 p. 100 de sérum de lapin stérile;
0,3 ml de culture à repiquer;
2 ml d'huile de vaseline.

d) *Résultats :* après un jour de culture à 37°, le fond du tube présente un floculat qui s'accentue dans les jours suivants. Le milieu rose, à l'origine, devient rapidement jaune paille (resazurine - indicateur de réduction).

Au fond noir, on constate des massifs, de grosseurs variables, dans lesquels s'intriquent des tréponèmes longs et extrêmement vivaces. Le reste du milieu est limpide, ne contenant que peu de tréponèmes.

Au microscope à contraste de phase, les massifs semblent être constitués d'un substrat amorphe. On y distingue quelques formes aberrantes, rondes et vésiculeuses. La culture pousse bien et le floculat s'accentue avec le temps.

A la phase d'expansion logarithmique, le milieu est entièrement trouble et les tréponèmes se rencontrent en dehors des massifs amorphes (agar), mais leur concentration dans la partie limpide est très nettement inférieure à celle que l'on a dans les amas.

Après douze jours environ, la partie supérieure du milieu devient progressivement limpide. Au fond, se concentre un gros floculat ne contenant que des formes rondes.

Les numérations et l'examen des formes vivantes, dans ce cas, sont donc faussés par la présence d'agar.

2° *Milieu V.F. thioglycollate de Na*

Le bouillon V.F. (viande-foie) est un milieu liquide préparé par l'Institut Pasteur. Il est limpide, ne contient pas d'agar, mais on ne peut l'employer sans addition d'un réducteur. Le réducteur est l'acide thioglycollique qu'il faudra neutraliser, ou le thioglycollate de soude.

a) *Gamme :* on constitue une gamme de tubes contenant 10 ml de milieu V.F. à 0,5, 1, 1,2, 1,4... 3 p. 1.000 de thioglycollate de soude. On stérilise à l'autoclave pendant vingt minutes à 120°.

b) *Repiquage :* on mélange 6 ml de culture de tréponèmes sur milieu Brewer et 12 ml de sérum de lapin stérile. Un volume de 1,5 ml de ce mélange est immédiatement introduit dans chacun des milieux de la gamme précédente. Enfin, tous les milieux sont recouverts d'huile de paraffine (2 ml environ).

c) *Résultats :* le développement se fait en massifs peu visibles à l'œil nu avant un à deux jours, suivant les tubes.

L'examen au microscope à contraste de phase montre

que ces massifs sont moins volumineux, plus compacts que précédemment. Ils sont extrêmement riches en tréponèmes et en forme aberrantes. Leur nombre et leur volume augmentent progressivement. Mais on ne peut les dissocier sur lame, même après repérage au microscope à contraste de phase.

La vitesse de pousse semble être de plus en plus faible, à mesure que l'on s'écarte de part et d'autre de la concentration de 1,2 à 1,4 p. 1.000 en thioglycollate de Na.

Pourtant, le tube à 3 p. 1.000 contient de nombreux spirochètes vivants après huit jours.

Ces expériences préliminaires montrent que le milieu Brewer est très pratique, mais, contenant de l'agar, il empêche toute numération et ne permet pas une bonne observation au microscope à contraste de phase.

Dans le cas du milieu V. F., l'échelle des concentrations en réducteur permettant un développement est étendue, mais la vitesse du développement est maximum pour une concentration de 1,2 à 1,4 p. 1.000 de thioglycollate de Na.

Pour avoir un développement « normal », on a donc choisi le milieu Brewer pour sa commodité, mais en le privant de son agar par filtration à froid (filtre sans cendre n° 111, disposé sur entonnoir de Buckner).

La conservation du milieu est aussi bonne.

La régénération est toujours nécessaire si le milieu est préparé depuis plus de trois jours.

B. — Description du développement « normal » sur milieu Brewer

Milieu Brewer filtré à froid.

Sérum de lapin : 10 p. 100.

Culture de spirochètes de six jours : 0,3 ml.

Huile de paraffine stérile : 2 ml environ.

Partant d'une culture âgée entretenue à 27°, et voulant obtenir une souche fixe, les repiquages sont faits régulièrement après six à sept jours à 37°.

Les tubes sont agités le plus souvent possible.

Après six à sept jours, la souche est laissée à 27°.

Après six repiquages, la souche se développe régulièrement. Le maximum d'éléments spiralés s'obtient en cinq à six jours.

1° *Description des formes au microscope à contraste de phase*

Le polymorphisme considérable du spirochète demande à être systématisé. Ainsi, en étudiant les diverses phases de culture, on pourra se référer aux schémas déjà indiqués.

Le polymorphisme est lié aux stades de développement. C'est pourquoi nous avons divisé les formes rencontrées en trois grands groupes :

— Formes spiralées (fig. 1, p. 30) ;

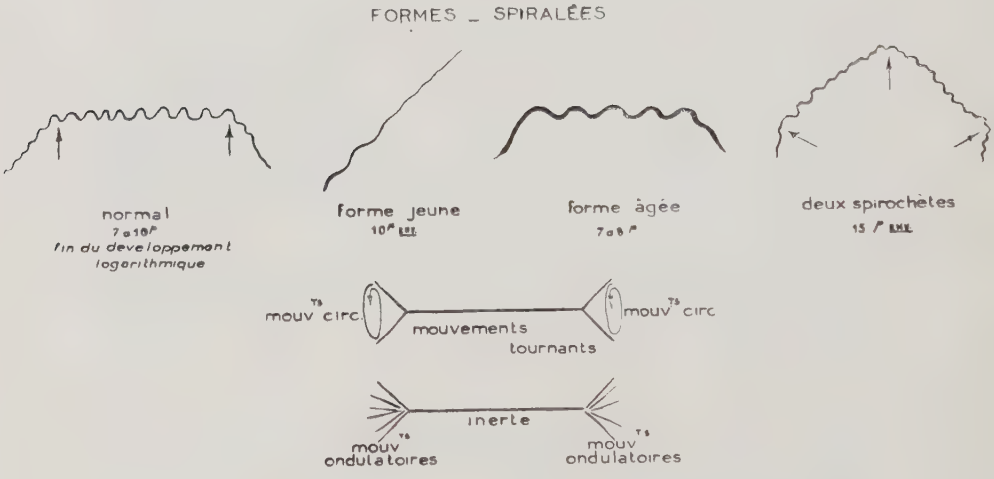


Fig. 1.

Formes spiralées.
Les principaux mouvements ont été schématisés d'après observations au fond noir.

— Formes atypiques, début de développement (fig. 2, p. 31) ;

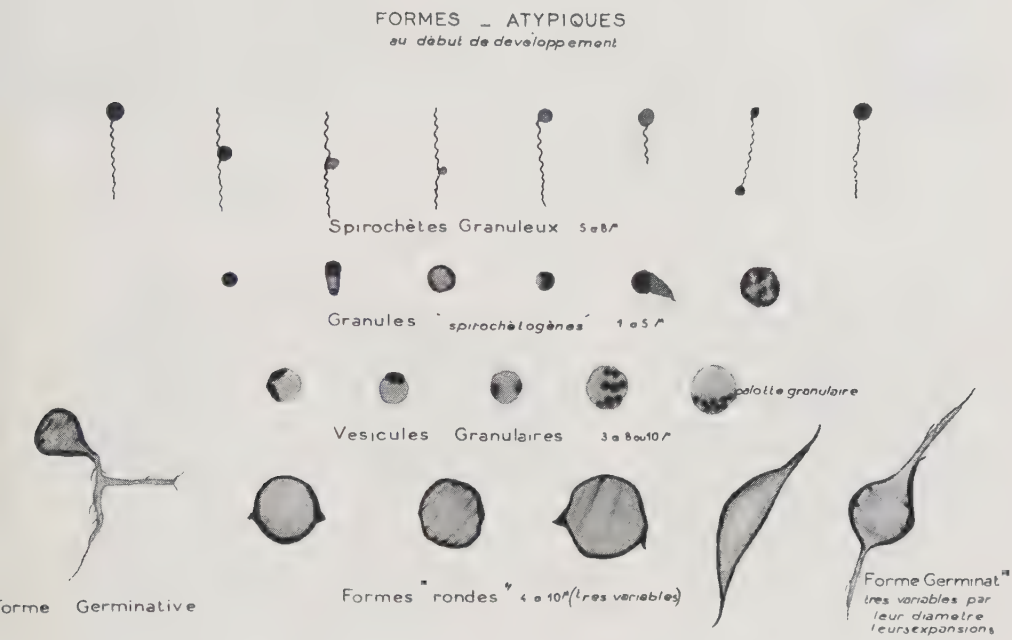


Fig. 2.

Principales formes atypiques
rencontrées au début des développements dans les micro-colonies
(schéma d'après observation au microscope à contraste de phase Zeiss-Opton).

— Formes atypiques, fin de développement (fig. 3, p. 32).

En réalité, il est parfois difficile de distinguer ces deux derniers groupes, et c'est le souci de systématiser qui oblige à créer des types entre des formes voisines, sans doute identiques; exemples : spirochètes granuleux, formes annulaires.

Ceci montre un point faible de l'observation à l'aide du microscope à contraste de phase.

Des formes, d'aspect semblable, peuvent différer par d'autres qualités.

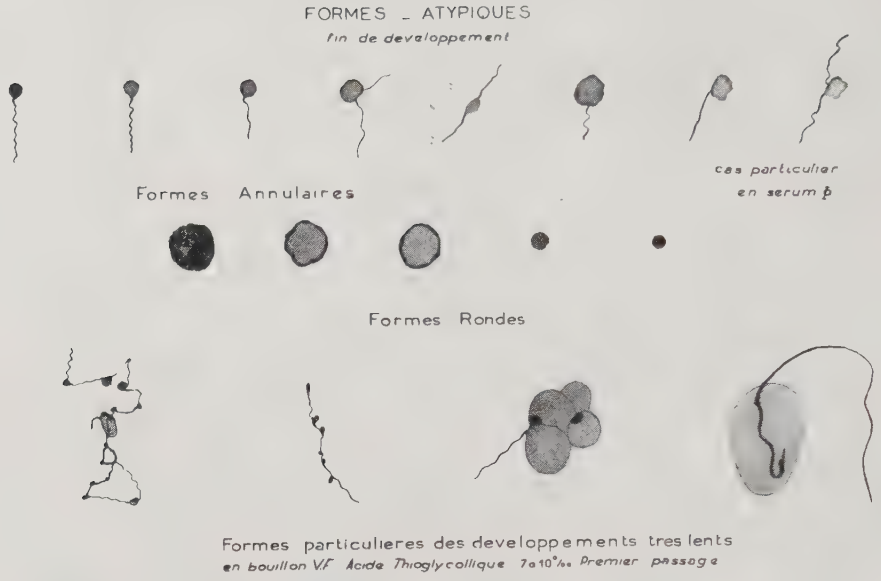


FIG. 3.

Principales formes atypiques rencontrées en fin de développement (d'après observation au microscope à contraste de phase Zeiss-Opton).

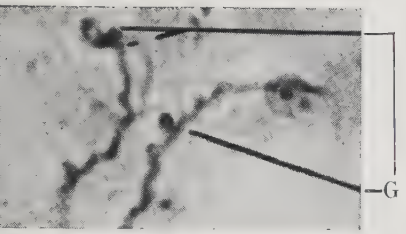
Des photographies ont pu être prises sur les éléments vivants ou sur des culots de centrifugation. Pour les plus petites formes (0,8 à 1 μ), sensibles aux mouvements Browniens, on immobilise dans de la gélose (fig. 4, p. 33).

2° *Description des phases de culture* (souche régulière) :

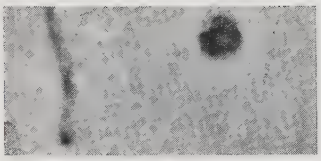
a) Demi-heure - une heure : dans la première heure, les tréponèmes, très vivaces, s'immobilisent.

b) Une heure - deux heures : on rencontre ensuite des faisceaux contenant 10 à 20 spirochètes. Parfois, on peut distinguer des formes rondes d'environ 2 à 4 μ.

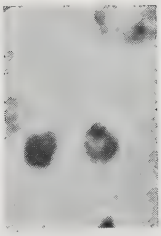
c) Trois heures - dix heures : après trois à quatre heures de culture, le nombre des formes granuleuses s'accroît sensiblement dans le milieu. Les tréponèmes typiques ne se



Spirochètes granuleux.
(G = granules.)

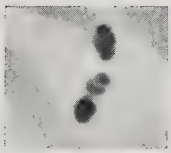


3 à 4 μ



2 à 3 μ

Granules « spirochétogènes » à un ou plusieurs noyaux.

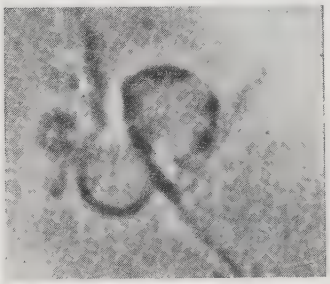


0,8 à 1 μ

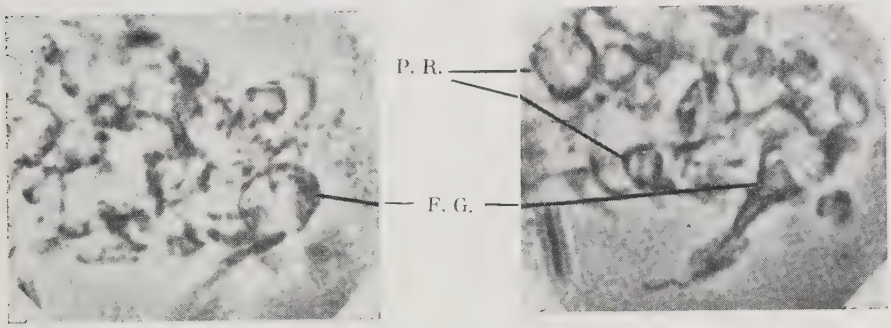
Granules spirochétogènes
(immobilisation en gélose).

8 à 10 μ

Vésicule granulaire
avec calotte granulaire.



Deux formes germinatives.



Forme germinative.

Plan moyen. Plan supérieur.

FIG. 4.

Formes atypiques rencontrées au début des développements.

Photographies faites au microscope à contraste de phase, sur une culture de 6 h. 30 en milieu de Brewer, centrifugée et reprise par le sérum physiologique phéniqué à 0,5 p. 100.

retrouvent plus à l'état libre, mais concentrés en amas caractéristiques des débuts de pousse, ce que nous dénommerons, par commodité : *micro-colonies*, qui sont très ténues; vu leur taille (20 μ) et leur constitution, il est impossible de les dissocier.

Les micro-colonies grossissent et deviennent parfois volumineuses. Si on fait le prélèvement dans le haut du tube, les micro-colonies sont rares et petites. Par contre, dans le fond, elles sont beaucoup plus nombreuses et leur taille est plus importante. Il semble que ces micro-colonies proviennent de la juxtaposition de plusieurs petites micro-colonies, elles-mêmes provenant des faisceaux spirochétiens. Ces micro-colonies sont désormais facilement repérables entre lame et lamelle, et nous avons cherché à les dissocier.

Avant la dissociation, elles se présentent comme des masses denses présentant des épaississements foncés, circulaires, desquels émergent, sur le pourtour, de nombreux tréponèmes très fins, peu spiralés, plus longs que le tréponème type (10 à 15 μ), et qui sont extrêmement vivaces. Dans le milieu environnant, peu de formes, sinon des formes granulaires très denses, vésiculaires, vésicules d'un ou plusieurs granules (le plus souvent les formes se rencontrent sur le pourtour même de la micro-colonie) et évidemment des spirochètes, mais en pourcentage très faible.

Après dissociation, on y rencontre un grand nombre d'éléments spiralés, mais en fait peu sont typiques, le plus grand nombre correspondant, en réalité, aux spirochètes granuleux ou aux formes germinatives de toute taille (fig. 4, 5 et 6).

Il faut y joindre des formes rondes, annulaires, etc.; il y a donc un grand mélange de formes.

La fig. 5 montre quelques micro-colonies vivantes où l'on rencontre les éléments décrits.

La phase que l'on vient de décrire est relativement longue. Le milieu reste parfaitement limpide si l'on n'agite

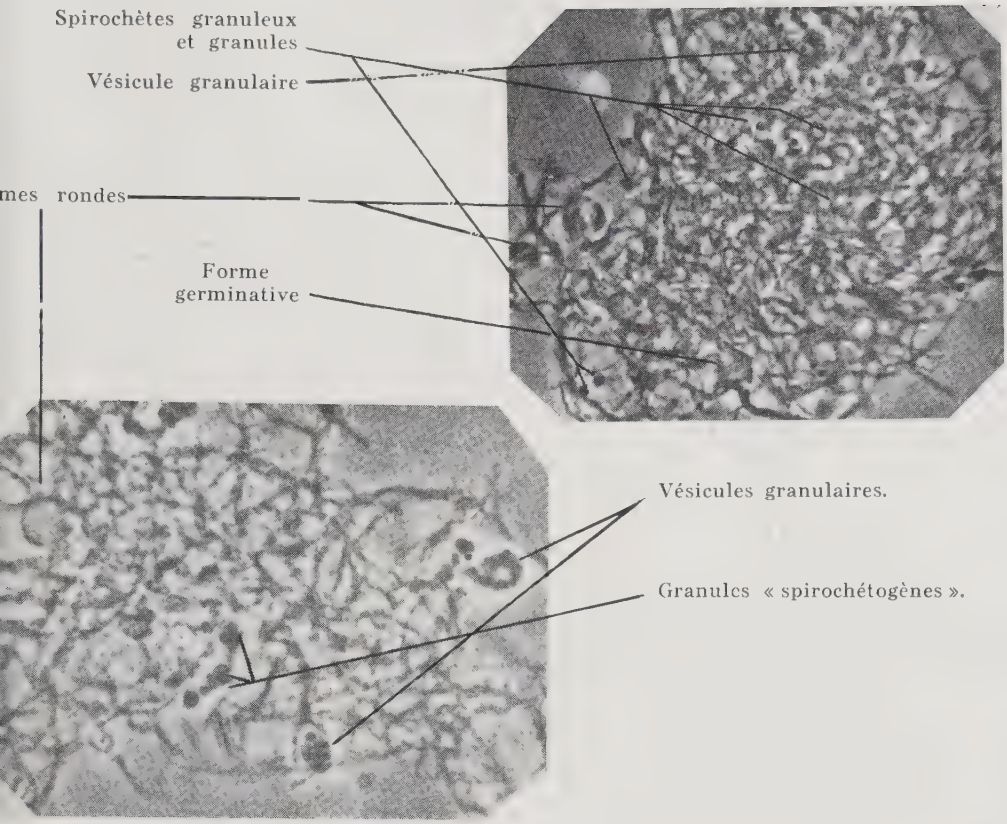


Fig. 5.

« Micro-colonies » des débuts de développement.

Photographiés faites au microscope à contraste de phase sur une culture de 6 h. 30, *vivante*, en milieu de Brewer.

pas. D'ailleurs, l'agitation ne dissocie pas toutes les micro-colonies qui ne tardent pas à sédimenter de nouveau. Quand, après un ou deux jours, elles deviennent importantes (sorte de voile ténu), l'agitation les dissocie plus ou moins, mais sans homogénéiser complètement le milieu.

d) Deux jours : la turbidité du milieu s'accroît progressivement, même sans aucune agitation. C'est la phase d'expansion spirochétienne.

Par agitation, les colonies se dissocient plus facilement, et on constate que leur dissociation est totale, une fois que la phase maximale de culture est atteinte.

Formes germinatives.
Culture Brewer : trois jours, contraste de phase Zeiss-Opton. Immersion.

Fig. 6.

Prélèvement avant agitation. — Haut du tube : pourcentage maximum de spirochètes typiques; fond du tube : pourcentage très inférieur de spirochètes.

Sur lame, il existe encore quelques colonies; on constate autour un nuage de formes rondes ou granuleuses. La dissociation sur lame est extrêmement facile et révèle un nombre toujours très important de formes atypiques, notamment des formes germinatives.

e) Quatre à cinq jours : phase dite « maximale » : les spirochètes sont typiques, bien spiralés, l'axe de la spire présentant, la plupart du temps, un recourbement aux deux extrémités.

Si l'on maintient la culture à 37°, cette phase a peu près pure est de courte durée; le nombre de formes spiralées typiques ne tarde pas à décroître. Ainsi débute l' « involution » de la culture.

f) Phase dite « involutive » : le nombre des formes atypiques, en particulier annulaire, s'accroît assez vite. Mais on a aussi des spirochètes granuleux puis des formes rondes et granules qui correspondent très probablement à celles décrites par tous les auteurs. Là encore, la scission avec les formes du début de développement n'est pas nette.

La fin de culture est caractérisée par la présence, presque unique, de ces formes rondes de toutes tailles (de 2 à

15 μ), plus ou moins denses, plus ou moins homogènes.

On ne rencontre que peu de formes « germinatives ». Notons que les formes rondes, par leur diversité de taille, peuvent être très petites et assimilables aux granules spirochétogènes.

Remarque. — Au cours des premiers passages, on a, comme le disent Rose et Morton, des cultures riches en formes rondes et qui se développent lentement.

Le nombre de spirochètes, après six jours, s'accroît progressivement pour se stabiliser ensuite à un taux moyen d'environ 8 à 10.000 spirochètes par 1/100 mm^3 (tableau I).

La morphologie des formes atypiques reste identique à celle qui a été déjà décrite. Seul le nombre est plus important.

3° *Numération*

Nous avons vu que le procédé de numération classique sur un prélèvement aseptique n'est possible qu'après un certain temps de culture. En effet, il est impossible d'obtenir un prélèvement suffisamment homogène avant deux jours. Cependant, l'allure des courbes obtenues, en particulier celles des pourcentages en formes atypiques, sont significatives.

a) *Pourcentage des formes atypiques.* — Pour tout développement, le taux en formes atypiques de tout genre augmente dans les deux premiers jours de culture, puis passe par un minimum correspondant à la fin de la phase logarithmique de croissance. Il s'élève à nouveau en fin de culture sans atteindre 100 p. 100, car il reste toujours des éléments spiralés morts (fig. 7, p. 38).

Cette courbe est absolument fondamentale. Ses variations sont toujours rencontrées au cours de tous les développements. Seules l'allure, l'intensité, l'ampleur de ses variations sont modifiées en fonction de la vitesse des développements, comme nous le verrons plus loin.

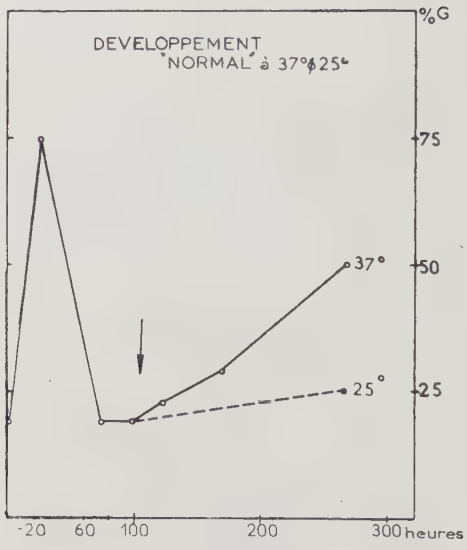


FIG. 7.

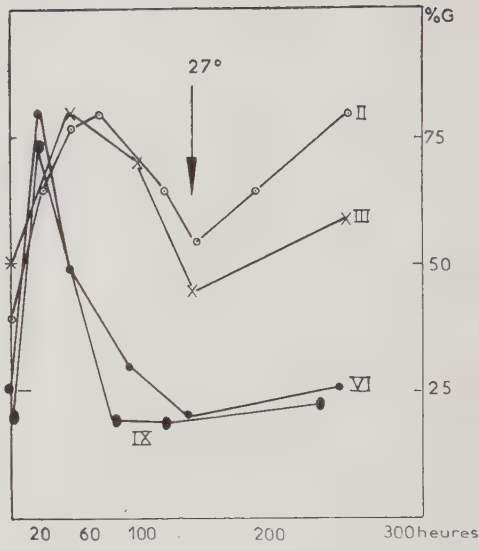


FIG. 9.

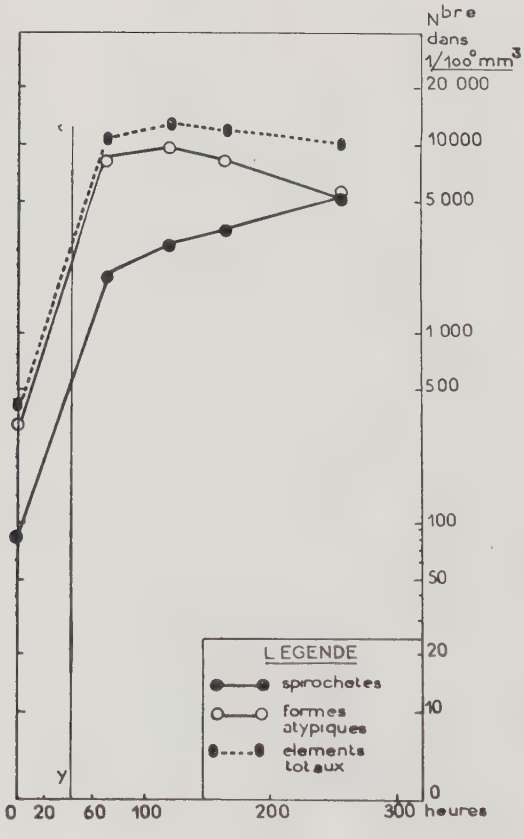


FIG. 8.

FIG. 7. — Variation du pourcentage (p. 100 G) en formes atypiques au cours des développements sur milieu de Brewer, soit entièrement à 37°, soit à 37° pendant quatre à cinq jours, puis à 25° (la flèche indique le moment du passage à 25°).

FIG. 8. — Variation du nombre des éléments spiralés atypiques et totaux au cours du développement sur milieu de Brewer à 37°. La droite x-y marque le temps approximatif pendant lequel l'hétérogénéité de la culture ne permet pas de numération (courbes en coordonnées semi-logarithmiques).

FIG. 9. — Influence des passages successifs sur le milieu de Brewer II, III, VI, IX : repiquage II, III, VI, IX.

Mais déjà on peut signaler qu'au cours de repiquages successifs et réguliers, à partir d'une ancienne souche, le minimum de cette courbe s'abaisse et va se stabiliser à une valeur de 10 à 20 p. 100 dans les cinq à six jours (fig. 9, p. 38).

b) *Eléments totaux. - Eléments spiralés. - Eléments atypiques.* — Le nombre d'éléments totaux passe par un maximum. Après la phase logarithmique, il décroît toujours, ceci pose le problème d'une recombinaison des éléments spiralés ou d'une autolyse partielle (fig. 8).

TABLEAU I

DÉVELOPPEMENT SUR LE MILIEU BREWER.

Formation d'une souche régulière par repiquage régulier sur un même milieu (M. BREWER filtre à froid); on rencontre deux anomalies : les repiquages nos I et II. Au repiquage n° II, le nombre d'éléments totaux est faible, pourtant son développement est plus rapide que le repiquage n° I. Les repiquages nos VI et VII : même remarque.

REPIQUAGE Nos	AU MOMENT DU REPIQUAGE			p. 100 G	DÉVELOPPEMENT	Après 6 j., S
	G	S	T			
I...	78	150	228	34,5	Lent	1.100
II...	110	38	148	55,4	Plus rapide	1.600
III...	100	110	220	45,5	—	2.700
VI...	75	75	150	50	Rapide malgré un nombre initial faible.	7.000
VII...	100	300	400	26,3	—	8.500
VIII...	90	280	370	25,7	Régulier	10.000
IX...	100	340	440	20,7	—	10.000
X...	100	350	450	23,1	—	7.000

G : nombre de formes atypiques pour 1/100 mm^3;
S : nombre de spirochètes typiques pour 1/100 mm^3;
T : nombre d'éléments totaux pour 1/100 mm^3;
p. 100 G : pourcentage des formes atypiques;

La courbe des numérations des éléments spiralés n'offre aucune particularité, la méthode employée ne permettant pas de suivre leur nombre dans les toutes premières heures de culture.

Par contre, il est curieux de constater que le nombre de formes atypiques s'accroît constamment même à la phase logarithmique correspondant en somme à la phase d'expansion de la forme spiralée.

4° *Enregistrement cinématographique en contraste de phase*

C'est évidemment la technique idéale chaque fois qu'elle est possible.

Dans le cas particulier des spirochètes, on se heurte à trois problèmes :

— Réduire les mouvements spirochétiens pour permettre une photographie au 1/25e de seconde restant nette;

— Réduire l'épaisseur du verre et de la lame afin de conserver un bon contraste;

— Réduire le temps d'éclairage au minimum.

On ne peut, dans le premier cas, employer ni l'agar, ni la gomme arabique : ils précipitent au cours du développement, ce qui gêne l'examen microscopique, en particulier pour les éléments qui nous intéressent. Les Tween seraient plus pratiques, mais ils peuvent s'hydrolyser par vieillissement, par stérilisation à l'autoclave. Sérum ou plasma recoagulé sur lame risque d'interférer sur le développement, modifiant la composition du milieu.

Dans le deuxième cas, jamais un développement n'a été obtenu par culture en lame mince. Seules les cultures sur lames à cupule permettent un développement *in situ*. Malheureusement, ces lames sont épaisses ainsi que la couche liquidienne (les éléments décantant aux premiers stades, le début de développement se produit au centre géométrique de la cupule, donc là où la couche liquidienne est la plus épaisse).

La technique n'est donc pas au point, elle s'avère très délicate.

5° *Conclusion*

Par passage sur milieu Brewer privé d'agar, par filtration à froid, on obtient un très bon développement en six jours environ, mais on ne supprime jamais le phénomène granulaire initial, particulièrement intense dans des microcolonies de six heures à deux jours. La détermination des différents pourcentages en formes atypiques au cours du développement permet d'établir une courbe fondamentale. L'allure de cette courbe est caractéristique du développement de nos éléments.

Ce polymorphisme, caractéristique d'une jeune culture, se répète à chaque passage.

Que représente-t-il ?

Si l'on se base sur les travaux antérieurs, on ne devrait rencontrer ces formes qu'en fin de culture. Ce n'est pas le cas.

Doit-on recourir à l'hypothèse de Rose et Morton (passage dans un milieu *nouveau*) ? Non plus.

En lui-même, le polymorphisme rencontré dans de très jeunes colonies doit avoir une signification propre. Chaque passage d'un milieu *ancien* à un même milieu, mais *neuf*, le reproduit.

En fin de culture, les formes atypiques de tout genre abondent une nouvelle fois.

La forme que nous appelons « germinative » est la seule qui soit particulière aux premiers jours de culture.

Il existe bien un véritable cycle ou mode de développement des cultures de spirochètes. Nous rejoignons ainsi une hypothèse, souvent critiquée, datant de la découverte même de l'agent pathogène de la syphilis : celle de Schaudinn.

C. — Développement dirigé

Nous appelons développement dirigé un développement influencé volontairement par variation d'un facteur.

1° *Réducteur*

a) *Acide thioglycollique.* — Le milieu Brewer contient déjà deux réducteurs : le chlorhydrate de cystéine, l'acide thioglycollique.

Le milieu V. F. ne permet pas de développement sans addition d'un réducteur. Il est donc préférable de l'utiliser pour étudier l'influence des réducteurs sur le développement.

Expériences :

Premier passage. — On constitue d'abord une gamme de tubes V. F. de 10 ml contenant 1, 2, 3... 10 p. 1.000 de thioglycollate de soude (DIFCO).

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant vingt minutes à 120°.

Remarque : pour la commodité de l'exposé, les tubes contenant 1, 2... 10 p. 1.000 en thioglycollate de Na sont dénommés tubes 1, 2... 10.

Repiquage : on mélange 3 ml de culture sur milieu Brewer de quinze jours, à 10 ml de sérum de lapin. 1,3 ml de ce mélange est immédiatement inoculé dans chacun des dix tubes de la gamme. On recouvre par 2 ml d'huile de paraffine stérile. Après neuf jours d'étuve à 37°, tous les tubes sont mis à 25°.

Deuxième passage. — Après vingt jours de culture, 0,3 ml de chacun des tubes de la première gamme sont introduits dans une deuxième gamme équivalente et préparée de façon identique. Après huit jours d'étuve à 37°, l'ensemble des tubes est mis à 25°.

Troisième passage. — On procède comme au précédent repiquage.

Résultats :

Comme on l'a déjà vu, l'échelle des concentrations en thioglycollate permettant le développement est très large. Mais trois faits ressortent :

— La vitesse du développement,

— L'adaptation des micro-organismes par passage,

— Les formes rencontrées et l'importance du phénomène granulaire initial.

La vitesse du développement. — Les tubes 1 et 2 ont un développement très rapide, beaucoup plus rapide que sur le milieu Brewer, même après de fréquents repiquages.

Pour des concentrations supérieures en thioglycollate, le développement peut être suivi plus facilement. La vitesse de pousse est inversement proportionnelle à cette concentration.

Pour les tubes 9 et 10, après dix jours, apparaît un floculat qui rend les numérations difficiles.

La figure 10 schématise le résultat des numérations au premier passage.

La courbe reliant les différents taux de spirochètes passe par un maximum correspondant au tube 3 après neuf jours, au tube 5 après vingt jours. (Le tube 4 a été cassé deux jours après le début de l'expérience.)

En effet, après neuf jours :

Les tubes 1, 2 et 3 sont en phase post-logarithmique. Mais les vitesses de développement n'étant pas identiques, le nombre de spirochètes, après un même temps de culture, est différent.

Les tubes 5, 6, 7, 8, 9 et 10 sont encore en phase pré-logarithmique. Le retard étant progressivement croissant, la teneur du milieu en spirochètes est de plus en plus faible.

Après vingt jours :

Le tube 1 ne contient plus de formes spiralées.

Les tubes 2 et 3 en contiennent peu.

Mais les autres tubes sont plus riches en spirochètes

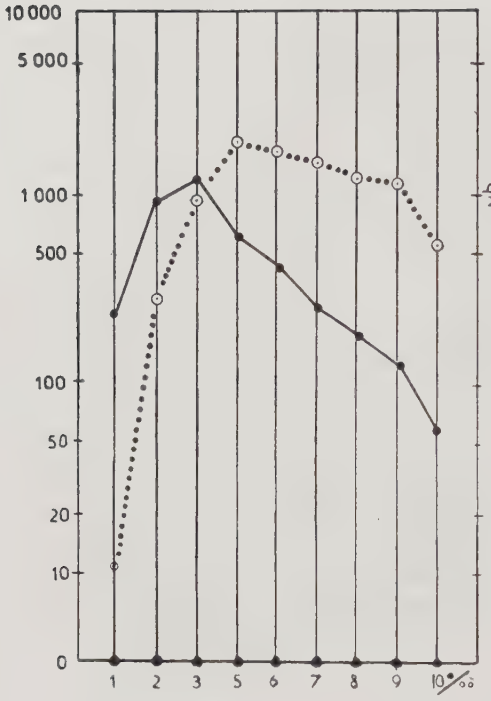


Fig. 10.

Premier passage sur des milieux V. F. contenant de 1 à 10 p. 1.000 de thioglycollate de Na. (Le tube contenant 4 p. 1.000 de thioglycollate s'est brisé après deux jours.)

Abscisse : concentration en réducteur;

Ordonnées logarithmiques : nombre d'éléments spiralés :

— Après 9 jours (trait plein);
— Après 20 jours (trait pointillé).

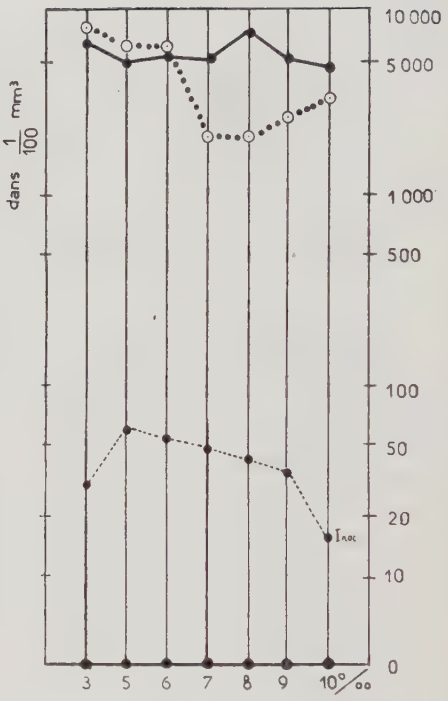


Fig. 11.

Deuxième passage sur des milieux V. F. contenant de 3 à 10 p. 1.000 de thioglycollate de Na. (Les tubes 1 et 2 n'ont présenté aucun développement.)

Abcisse : concentration en réducteur;

Ordonnées logarithmiques : nombre d'éléments spiralés :

— Introduits au repiquage (Inoc.);
— Après 6-7 jours (trait plein);
— Après 10-12 j. (trait pointillé).

qu'après neuf jours. Là encore, la courbe passe par un maximum (tube 5 et non tube 3), marquant ainsi l'influence de l'acide thioglycollique sur la vitesse de pousse.

Au deuxième passage (fig. 11), le développement est rapide dans l'ensemble des tubes (sauf pour les tubes 1 et 2 qui ne présentent aucun développement : les cultures

étaient donc mortes). Le nombre maximum d'organismes spiralés est plus important dans l'ensemble. Cependant, les tubes 7, 8, 9 et 10 montrent un développement plus rapide que les tubes 3, 5 et 6. Après douze jours, le nombre de spirochètes tombe dans les premiers tubes et s'accroît dans ces derniers.

Résultat paradoxal, car le nombre d'éléments spiralés introduit lors du repiquage est inférieur dans les tubes 7, 8, 9 et 10.

Au troisième passage, tous les tubes (3 à 10) se développent en huit à dix jours.

La vitesse de développement dépend donc de la concentration en réducteur pour le premier passage.

Pour le second et le troisième, d'autres facteurs entrent en jeu : l'adaptation à des concentrations en réducteurs importantes et la phase granulaire.

L'adaptation. — On peut penser que la vitesse de développement exprime en quelque sorte l'adaptation plus ou moins grande des organismes au milieu, lors du premier passage. En effet, lors du deuxième passage, le nombre de spirochètes obtenus est plus élevé.

Le troisième passage n'apporte pas de changement notable pour les tubes 3, 5 et 6.

Mais les tubes 7, 8, 9 et 10 présentent à leur tour un nombre de spirochètes équivalent à 6-7.000 pour 1/100 mm^3.

Ainsi, pour ces derniers (haute concentration en réducteur), il faut un passage supplémentaire.

Il y a donc une adaptation des spirochètes au milieu, et cette adaptation demande un nombre de passages d'autant plus élevé que la concentration en réducteurs est plus importante.

Après trois passages, toutes les souches présentent le même développement.

Pourtant, on ne peut envisager que cette hypothèse.

Pour les concentrations à 1 et 2 p. 1.000 en thioglycollate

de Na, il n'y aurait pas d'adaptation. Le développement est plus rapide que sur le milieu Brewer.

Au deuxième passage, nous n'aurions pas le résultat paradoxal déjà signalé.

Il faut tenir compte d'autres facteurs, notamment le phénomène granulaire initial.

Le phénomène granulaire initial :

Son importance. — D'une manière assez générale, lors du premier passage, le changement de milieu ne fait pas apparaître de formes atypiques particulières. Pour les hautes concentrations en réducteurs, on constate quelques formes curieuses, mais leur nombre reste faible (fig. 3, p. 32).

C'est plutôt le taux et la disposition des éléments atypiques qui sont influencés par le réducteur.

Le taux. — L'étude du développement en milieu Brewer a permis de mettre en valeur l'importance des courbes en pourcentage de formes atypiques. Nous avons vu, en particulier, l'existence d'un phénomène granulaire se reproduisant à chaque passage d'un milieu ancien à un milieu neuf de même composition.

On constate ici que le passage dans un milieu de composition différente n'entraîne pas de formes atypiques particulières. La courbe fondamentale, avec ses trois phases, se retrouve ici. Mais l'allure de cette courbe est variable selon la concentration des milieux en réducteur. Pour les concentrations de 1 et 2 p. 1.000 en thioglycollate de Na, les variations sont fugaces. Au contraire, pour les concentrations plus élevées (de 5 à 10 p. 1.000 en thioglycollate de Na), les variations sont lentes ou très lentes. Aussi l'inoculum, au deuxième passage, est-il différent d'un tube à l'autre, et s'il l'est peu au point de vue quantitatif, il l'est surtout au point de vue qualitatif. Ainsi la valeur réelle d'un inoculum dépend de la phase dans laquelle on l'a prélevé. La vitesse du développement au deuxième passage semble

reliée au pourcentage de formes atypiques de début de culture contenu dans l'inoculum.

Cela met singulièrement en évidence l'importance toute particulière de la phase granulaire initiale dont la valeur et la signification biologique sont certaines. Le nombre d'éléments spiralés n'est pas le facteur le plus influent dans un repiquage. La phase granulaire est responsable du fait paradoxal. Le stade d'une culture que l'on repique (c'est-à-dire la quantité et surtout la qualité de l'inoculum) apparaît comme un facteur primordial.

Jusqu'ici, nous n'avons parlé que de formes atypiques totales, c'est-à-dire de tout ce qui n'est pas formes spiralées. Nous avons vu quelle diversité caractérise ces formes. Là encore, la vitesse de développement — ou l'influence du réducteur — intervient en modifiant les proportions relatives : les formes « germinatives » se rencontrent abondamment dans les développements rapides. Les milieux riches en réducteurs en contiennent moins, alors que les formes granulaires et surtout vésiculaires sont abondantes, les formes rondes très régulières. A l'intérieur du groupe des formes atypiques, il faudrait tenir compte des taux particuliers en formes granulaires, rondes, germinatives, etc., et de la variation de ces taux particuliers.

L'aspect du développement. — Il est modifié également : les micro-colonies sont de moins en moins ténues, volumineuses, organisées, lorsqu'on passe du tube 1 au tube 10. Le nombre d'éléments libres dans le milieu est progressivement croissant. Si les milieux les plus riches en réducteur ne floculaient pas, on aurait des milieux homogènes par simple agitation.

Conclusion. - Discussion.

La vitesse de développement est très nettement influencée par la concentration en réducteur. Par passage, le nombre des spirochètes augmente, exprimant ainsi l'adaptation de ces micro-organismes à de nouveaux milieux.

Mais la mise en valeur d'une phase granulaire initiale perturbe les résultats. En effet, la valeur des milieux et l'adaptation des organismes à ces milieux sont habituellement jugés par des numérations de la forme dite normale de l'organisme mis en jeu : ici ce serait la forme spiralée.

En réalité, nous avons vu qu'elle n'était pas la seule à intervenir. Pour comparer entre eux des milieux différents, il faudrait désormais partir d'un élément identique : l'inoculum, et ceci pour un nombre de passages indéterminés.

Quoi qu'il en soit, c'est le phénomène granulaire initial qui reflète le mieux toutes les variations obtenues. Il est en rapport direct avec la vitesse de développement et apparaît en quelque sorte comme le « réacteur » à l'agent chimique employé.

Ces résultats s'obtiennent également pour d'autres réducteurs soufrés, tels que chlorhydrate de cystéine et acide thiomalique : une concentration optima donne un développement rapide; de part et d'autre de cette concentration, il est plus lent. La répercussion sur le péhnomène granulaire est similaire. Le fait que ces concentrations optima sont à peu près équivalentes par le soufre est assez remarquable.

Le soufre réducteur pourrait agir sur certaines réactions enzymatiques, les accélérant ou les retardant suivant la concentration de cet élément dans le milieu. Mais le soufre n'intervient pas seul, le reste de la molécule joue également un rôle, car, comme l'ont montré Eagle et Steinman [23], la cystéine est un meilleur « facteur de croissance » que l'acide thioglycollique. Sans doute, est-ce dû à la fonction acide aminé de la cystéine; la cystéine serait à la fois facteur de croissance et métabolite. Les autres réducteurs étant plus particulièrement des facteurs de croissance.

Les auteurs n'ont cependant pas mis l'accent sur les modalités du développement dans les milieux contenant ces différents réducteurs soufrés, aussi est-il difficile de comparer tous les résultats.

2° *Autres facteurs influençant le développement*

a) *Température.* — Sur le milieu Brewer, le tréponème peut cultiver à 27° ou à la température ordinaire de 18° (le conserver toujours à l'abri de la lumière). Mais la vitesse de développement devient faible ou très faible.

Lorsque la souche n'est mise à 25° qu'après cinq à six jours de culture à 37°, on peut conserver beaucoup plus longtemps la forme spiralée à un taux de 10 à 20 p. 100, comme le montre la figure 7, p. 38. L' « involution » est considérablement ralentie, ce qui est un phénomène normal.

Mais si la souche est constamment maintenue à la température de 25°, le début du développement est alors touché par ce facteur physique. Le développement étant très lent, la phase granulaire initiale sera longue et, comme dans le cas des milieux V. F. contenant de hautes concentrations en réducteurs, le pourcentage des formes atypiques restera constamment élevé. L'amplitude des variations de ce pourcentage reste faible, le minimum difficile à fixer, et l'on est en droit de penser qu'il n'y a pas de phase logarithmique de croissance.

Ces résultats rejoignent ceux que l'on obtient avec des milieux V. F. riches en réducteur. Là encore, en diminuant la vitesse de développement, on augmente la durée et l'importance du phénomène granulaire initial en le rendant pour ainsi dire continu.

Rose et Morton [53] ont déjà montré que l' « incubation à 24° favorisait l'apparition des formes annulaires ». Mais ils n'ont pas insisté sur le mécanisme qui les fait apparaître. Nous pensons que la température agit sur la phase granulaire initiale, propre à tous développements, en ralentissant les mécanismes de transformation. Là encore, la phase granulaire est un « réacteur » à un agent physique.

b) *Inoculum.* — Il semble intéressant de signaler l'influence de la dilution d'un inoculum sur le développement,

car les observations faites à ce sujet rejoignent les observations antérieures.

En effet, il est normal de constater que la vitesse de développement est proportionnelle au nombre d'éléments inoculés (fig. 12 et 13) mais, comme dans le cas précédent, la phase granulaire est de plus en plus longue en fonction de la dilution apportée.

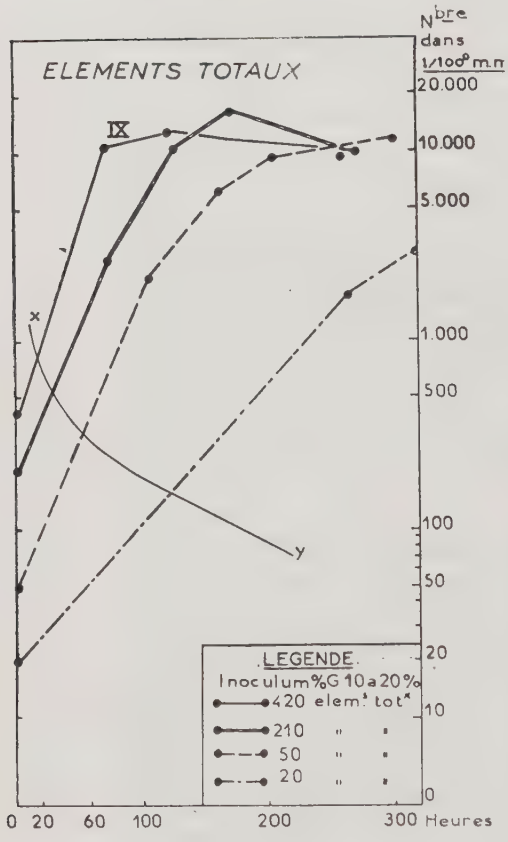


Fig. 12.

Influence de la dilution de l'inoculum sur la vitesse de développement : éléments totaux.

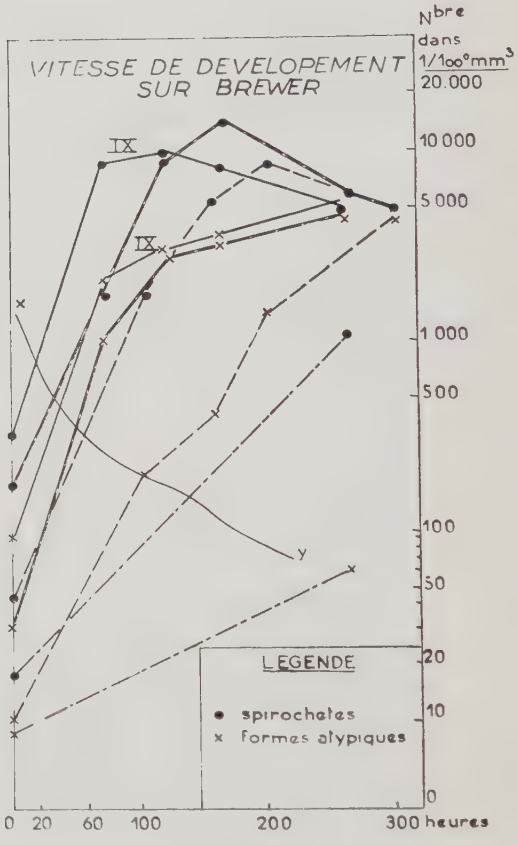


Fig. 13.

Influence de la dilution de l'inoculum sur la vitesse de développement : éléments spiralés et formes atypiques.

La droite x-y marque approximativement, sur chacune des courbes, « Eléments totaux » ou « Eléments spiralés », le temps pendant lequel le milieu est très hétérogène, empêchant toute numération valable.

Pour de grandes dilutions, on ne rencontre pratiquement plus de formes spiralées pendant un temps assez long, mais des amas granuleux amorphes. La souche semble morte. Cependant, ces amas s'organiseront et leur nombre augmentera lentement. On retrouve alors l'aspect classique des micro-colonies avec leurs nombreuses formes atypiques de tous genres.

Le développement est donc similaire au développement rapide, seule la vitesse est très abaissée. L'hétérogénéité du milieu, qui ne dure qu'un jour ou deux dans le cas du développement normal, peut se prolonger six à huit jours ou plus, suivant l'inoculum. D'ailleurs, même après ce stade hétérogène, la culture présentera toujours un pourcentage élevé en formes atypiques, à tel point qu'il est difficile de parler de développement logarithmique.

L'hétérogénéité des milieux, au début des développements, empêchant toute numération valable, nous avons voulu schématiser ce fait expérimental sur les figures 12 et 13. Pour chaque valeur de l'inoculum, l'abscisse du point d'intersection de la courbe x-y avec la courbe des éléments totaux (fig. 12) ou des éléments spiralés (fig. 13) représente approximativement le temps pendant lequel le milieu reste hétérogène après cinq à dix minutes d'agitation.

Ainsi, quel que soit le procédé permettant d'influencer le développement, c'est toujours la phase granulaire, son importance, sa durée qui expriment cette influence.

c) *Lumière.* — Ce facteur physique a été peu étudié.

Cependant, nous signalons qu'après un séjour de trois heures en lumière vive, la souche « s'involue » fortement. On voit augmenter rapidement le nombre des formes rondes. Nous avons cherché dans une expérience grossière la couleur la plus active. C'est la zone *bleue* qui fait apparaître le plus vite les formes rondes (en une heure : diminution importante du nombre de spirochètes typiques), puis le *vert,* enfin l'*orangé-rouge.*

La lumière ne tue pas brutalement. Et, comme pour tous

les agents physiques ou chimiques qui n'arrêtent pas sur le coup le développement, la forme spiralée se transforme en formes rondes.

Cela autoriserait à penser que ces formes sont l'expression d'une involution ou d'une résistance aux agents divers. En fait, le problème doit être plus complexe.

d) *Cas particulier.* — Si on laisse des spirochètes en présence de sérum physiologique, ils ne tardent pas à donner des images d'enroulement; les formes annulaires ont une structure très simple, comme le montre la figure 3, p. 32. Cette transformation est rapide : en une heure, 90 % des spirochètes sont devenus formes annulaires.

D. — Discussion

Que ce soit sur milieu Brewer ou sur milieu V. F., l'étude du développement permet de mettre en valeur plusieurs phases de culture formant un cycle :

— Phase granulaire initiale,

— Phases spirochétiennes proprement dites,

— Phase granulaire finale.

Ainsi s'expliquent certains travaux de Rose, Morton [53], Gelperin [29]. Mais ces auteurs n'ont pas distingué deux phases granulaires au cours du développement.

La mise en évidence d'une phase granulaire au début des développements nous rapprocherait de certains travaux antérieurs, tels ceux de Marchoux et Chorine [39, 40, 41] qui, sur un autre spirochète, *Sp. gallinarum*, montrent qu'à chaque passage, hôte définitif, hôte intermédiaire et vice-versa, il se produit une transformation en formes granulaires.

Certains facteurs agissent de façon très sensible sur cette phase, la rendant plus ou moins apparente.

Ce phénomène est donc toujours présent. Il est en rapport direct avec la vitesse de développement. Lorsque

cette vitesse est grande, il est fugace (développement sur milieu V. F. contenant 1 à 1,2 p. 1.000 d'acide thioglycollique). Pour des vitesses faibles, il est très marqué (milieux riches en réducteurs, incubation à 25°).

Son importance biologique apparaît certaine; il faut en tenir compte constamment, en particulier dans les inoculats où la quantité, mais surtout la qualité, interviennent.

C'est pour étudier et surtout comparer ces trois phases de culture que nous avons entrepris des recherches :

— Sur leur métabolisme,
— Sur leur « potentialité »,
— Sur leur constitution.

III. — VARIATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ET FORMES

Dans ce chapitre, nous étudierons quelques caractéristiques physico-chimiques : *p*H, potentiel de platine des milieux, et nous verrons s'il est possible de mettre en corrélation ces données et les formes rencontrées dans les milieux.

Ces variations physico-chimiques sont des résultantes, elles expriment, en résumé, les métabolismes des êtres vivants.

La recherche de ces données physico-chimiques n'est pas nouvelle en bactériologie classique. On sait, depuis longtemps, que les cultures de bactéries se développent dans des conditions réductrices et dans une zone relativement stricte de *p*H. Les premières méthodes utilisaient les colorants (indicateurs de *p*H ou de Redox). A l'heure actuelle, elles sont abandonnées au profit d'appareils de mesure plus sensibles et plus pratiques. Aussi, quoique l'on s'adresse à des milieux complexes et mal définis, de nombreuses courbes de *p*H et de Redox ont été obtenues.

Nous ne connaissons pas de travaux sur les potentiels de culture de *T. pallidum* souche Reiter, si ce n'est un article de Buça et Tager [8]. Ils utilisent la méthode de Thumberg

pour la détermination du pouvoir « déshydrogénant » de cette souche. Comme pour tous les micro-organismes, le potentiel de platine décroît au début des cultures. C'est un anaérobie, telles sont les données primordiales. Pourtant, dans notre cas, puisque deux formes existent en proportion variable à chaque instant, l'étude physico-chimique du milieu peut être intéressante.

Cette étude porte sur les premiers passages en milieu V. F. à concentration variable en réducteur. L'examen des formes et les numérations (deuxième procédé) sont menés de front, afin de comparer variation de formes et variation physico-chimique.

Ce chapitre comprend trois parties :

A. — Application des mesures potentiométriques en biologie;

B. — Matériel et méthode;

C. — Résultats. - Interprétation.

A. — Application des mesures potentiométriques en biologie

En plongeant une électrode réversible dans un milieu organique ou inorganique, il se crée une différence de potentiel entre cette électrode et le milieu. Sa valeur est fonction de ce dernier. Le potentiel du milieu résulte de l'ensemble des charges électriques existant au sein du milieu. Sa mesure se fait en constituant une chaîne électrolytique, dont le milieu est un maillon :

1° *Pour la recherche du pH*

Le problème n'est qu'un cas particulier de la mesure d'une concentration cationique à l'aide de l'électrode réversible correspondante (électrode à hydrogène), associée avec une autre électrode réversible; le tout forme une pile dont on calcule la force électromotrice.

L'électrode de référence est une électrode au calomel (fig. 18) (chlorure de mercure en équilibre avec du KCl). On emploie un pont de KCl, car l'ion K^+ a sensiblement la même mobilité que l'ion Cl^-, donc ce pont n'apporte pas de différence de potentiel propre.

L'électrode indicatrice est constituée par une bulle de verre spécial (Corning 015), d'épaisseur faible (1/10 mm environ), remplie d'une solution de *p*H connue dans laquelle est immergée une électrode au chlorure d'argent.

Lorsque la bulle est plongée dans une solution x, une différence de potentiel apparaît entre les deux faces de la bulle. Cette différence de potentiel est égale à 0 lorsque le *p*H du milieu x est égal au *p*H de la solution tampon de la bulle. De part et d'autre, la différence de potentiel est proportionnelle au *p*H du milieu.

2° *Pour la recherche des potentiels Red ox*

Electrode indicatrice : fil de platine poli;

Electrode de référence : électrode au calomel.

Il s'agit encore d'une mesure de différence de potentiel entre les deux pôles d'une pile.

a) *Origine des potentiels d'oxydo-réduction.* — On sait que l'accroissement de la valence ionique est l'équivalent d'une oxydation, la diminution de cette valence caractérise une réduction. Il n'est donc pas besoin de faire intervenir de l'oxygène pour avoir une oxydation, c'est le cas des systèmes biochimiques. Les réactions sont du type :

$$Fe^{+++} + e \leftrightarrows Fe^{++}$$

En plaçant, dans deux compartiments séparés par un diaphragme, chacun de ces deux ions, et en plongeant dans chacun d'eux une électrode inattaquable, on obtient un équilibre par fermeture du circuit. Fe^{3+} se réduit, Fe^{2+} s'oxyde. Cet échange d'électrons se produit également si l'on oppose deux systèmes oxydo-réducteurs, ce qui est la base des dosages oxydo-réductimétriques.

Les équations exprimant mathématiquement ce phénomène reposent toutes sur la théorie de Nernst. Une lame plongeant dans une solution de deux de ses sels, l'un oxydé, l'autre réduit, retient, à son voisinage, des ions oxydés et réduits de concentrations déterminées; le liquide lointain contient les mêmes ions à des concentrations différentes. En faisant varier ce système réversiblement et de façon infiniment petite, on aboutit, par le calcul des travaux électriques et osmotiques effectués au cours de cette transformation, à l'équation :

$$E = Eo + \frac{B}{(N - N')} \log \frac{1 - \alpha}{\alpha}$$

E = différence de potentiel obtenue;
Eo = potentiel normal d'oxydo-réduction;
$(N - N')$ = différence des valeurs ox et Red;
$B = \frac{RT}{F}$;
α = fraction réduite du système oxydo-réducteur.

Lorsque, par un moyen quelconque, on peut faire varier α, on obtient une courbe ordinairement en S à tangente peu inclinée pour E = Eo c'est-à-dire $\alpha = 0{,}5 = 1 - \alpha$ (fig. 14). Eo prend alors une valeur caractéristique du système envisagé.

Comme toute variation est relative par rapport à un point fixe, il faut fixer ce point en potentiométrie. Aussi, la valeur Eo ne peut être que repérée par rapport à la différence de potentiel analogue d'une électrode réversible qui forme pile avec elle.

On convient de prendre, pour cette dernière, l'électrode

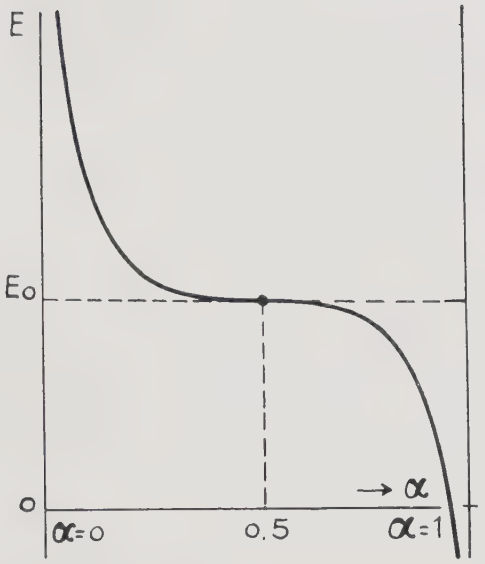


Fig. 14.

Variations du potentiel d'électrode dans le cas d'un système oxydo-réducteur (d'après Pascal).

réversible d'hydrogène, qui joue le rôle de pôle négatif, tandis que le métal fonctionne comme pôle positif (fig. 15).

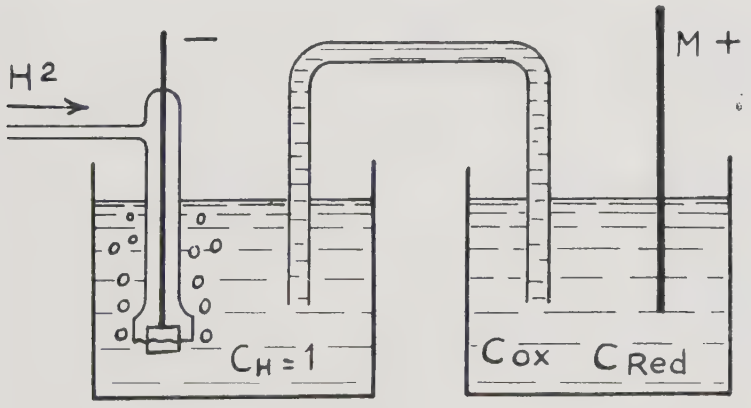


Fig. 15.

La concentration des ions H^+ étant, par *convention,* fixée à $C_H = 1$ ($pH = 0$), la force électromotrice de la pile ainsi constituée donne le potentiel normal d'oxydo-réduction (Pascal [48]).

C'est de cette comparaison avec l'électrode à hydrogène prise comme zéro que provient la notation *r*H. Quelle valeur possède cette notation ?

La mesure des potentiels d'oxydo-réduction se fait ordinairement avec une électrode de platine poli inattaquable. Cette électrode plonge dans une solution quelconque oxydo-réductrice. La théorie de Nernst, métal plongé dans deux de *ses* sels, ne pourrait à priori être utilisée. Pourtant, les variations théoriques se retrouvent expérimentalement si on additionne un oxydant ou un réducteur à la solution. Il faut donc avoir recours à des hypothèses pour expliquer l'origine des potentiels de platine.

C'est Clark qui préconisa la notation *r*H en assimilant l'électrode oxydo-réductrice à une électrode à hydrogène : dans toute solution oxydo-réductrice régnerait une pression pH^2 d'hydrogène moléculaire, pression d'ailleurs extrêmement faible. « Cette assimilation entre le potentiel d'une électrode de platine poli plongeant dans une solution oxydo-réductrice et le potentiel d'une électrode à hydrogène est *commode* mais non *indispensable,* elle postule la présence dans la solution d'une pression pH^2 d'hydrogène moléculaire qui, en fait, peut n'être que *purement fictive...* » (Carpeni, p. 129 [9]). La plupart se rattachent à cette hypothèse (Wurmser [65], Corre [11]).

Pascal arrive à des conclusions similaires à l'aide de notions moins théoriques. Remarquant que, dans l'équation citée, H serait ∞ lorsque $\alpha = 1$, il pense qu'on ne peut purifier totalement un système oxydant de traces réductrices et vice versa. Il attribue ces réactions secondaires aux ions de l'eau. H^+ est oxydant : il se dégage de l'hydrogène; OH^- est réducteur : il se dégage de l'oxygène. Les concentrations sont proportionnelles aux pressions. « Ainsi,

l'électrode est équivalente à une électrode à hydrogène plongeant dans un milieu *p*H et *p*OH donné et surmonté d'une atmosphère d'hydrogène ou d'oxygène sous la pression pH^2 ou pO^2. »

Cependant, le problème n'est pas résolu. Aussi, préférons-nous utiliser le terme de « potentiel de platine » qui traduit simplement l'existence véritable d'un potentiel dont l'interprétation théorique reste difficile, en particulier en milieu complexe et biologique.

b) *Caractéristiques particulières à nos milieux.* — Si on enregistre le potentiel platine aussitôt après la pose de l'électrode dans les milieux VF - acide thioglycollique, on obtient une courbe d'allure exponentielle :

$$E = ae^{-Kt}$$

E = potentiel de platine;
a et K = constantes;
t = temps.

Si le milieu n'évolue pas (avant ensemencement par exemple), le potentiel se stabilisera après trois à quatre heures.

Le milieu VF sans réducteur, le sérum de lapin, présentent le même phénomène avec des constantes a et K différentes.

Le potentiel de platine est long à s'établir. Nous ne pouvons expliquer ce phénomène, mais il n'est pas propre aux milieux biologiques complexes.

Pour les solutions As III/As V, par exemple, le potentiel d'équilibre est lent à s'établir; de plus, il est peu stable. Ces systèmes sont appelés « systèmes lents », car « le nombre d'électrons échangés par unité de temps est très petit, aussi l'électrode n'atteint que très lentement le potentiel d'équilibre ». Les milieux complexes organiques offrent peut-être la même caractéristique.

Dans l'un et l'autre cas, les potentiels sont instables. Toute perturbation (agitation, mise à la terre des électro-

des) entraîne une remontée du potentiel et l'équilibre n'est retrouvé que très lentement (deux à trois heures).

En principe, pour les systèmes lents, les variations de potentiels sont difficiles à suivre. Mais les cultures de micro-organismes anaérobies provoquent des variations suffisamment faibles dans l'unité de temps pour que l'électrode reste constamment en équilibre avec le milieu. Le micro-organisme est comparable à un réactif s'additionnant très lentement dans un milieu déterminé.

c) *Expression des résultats.* — Les variations de *p*H, en unité *p*H, et les variations du potentiel de platine, sont données séparément. La spécificité de ces dernières justifie ce mode d'expression.

B. — Matériel et méthode

A l'heure actuelle, les indications d'oxydo-réduction sont peu employées. Des appareils permettent de faire des mesures électrométriques de façon précise.

Ces mesures peuvent se faire soit point par point, soit par enregistrement.

1° *Point par point*

Afin d'opérer sur de petites quantités de milieu, nous avons fait exécuter une microcuve spéciale permettant des mesures de *p*H et potentiel de platine avec ou sans courant d'azote.

L'appareil de mesure est un *p*H-*r*H mètre.

Avant chaque mesure, la cuve est soigneusement lavée, l'électrode de platine flambée pendant quelques minutes à l'aide d'une lampe à alcool. L'étalonnage de l'appareil est fait à *p*H 7.

L'expérience commençait sur une culture VF : 1 p. 1.000 en acide thioglycollique.

a) *p*H. — Le *p*H se stabilise immédiatement si on n'opère pas sous azote (fig. 16).

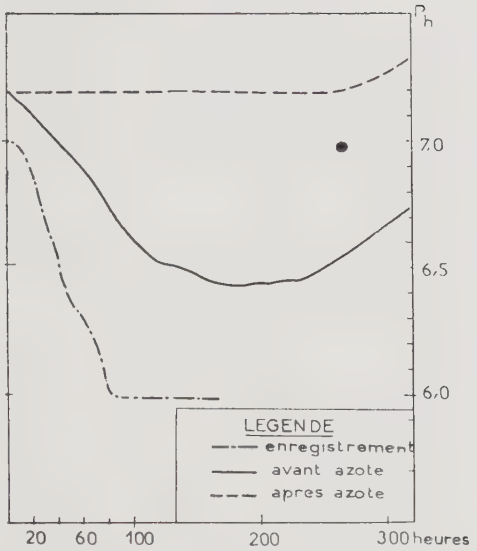


Fig. 16.

Evolution du p*H* dans le cas de culture en milieu V. F. contenant 1 p. 1.000 d'acide thioglycollique centralisé. Comparaison entre les méthodes :
— Point par point sur un prélèvement stérile, avant et après passage d'azote;
— Enregistrement.
Un barbottage d'azote insuffisant nous a donné un point isolé.

Le courant d'azote provoque une élévation progressive du *p*H jusqu'à l'obtention d'une valeur constante, égale au *p*H du milieu avant ensemencement. Ce phénomène serait probablement dû à l'élimination des produits de déchets cellulaires et en particulier CO_2.

En fin de culture, une élévation du *p*H se produit si l'on opère sans azote. Mais, sous courant d'azote, il monte à une valeur supérieure au *p*H (avant ensemencent). Nous pensons qu'il y a là une influence des produits de dégradation et d'autolyse, car la culture n'est plus repiquable.

b) *Potentiel de platine.* — Nos milieux sont des systèmes « lents » et la stabilisation du potentiel de Pt est réalisée

très lentement. L'obtention de cet équilibre est d'ailleurs tout à fait irrégulière, la pente des courbes n'est pas souvent identique. En effet, trop de facteurs jouent (flambage de l'électrode du Pt poli peut-être). Il aurait fallu attendre plus de quatre heures, mais alors d'autres facteurs interfèrent (transformation des organismes par séjour à l'air et à la lumière).

L'ensemble des mesures est absolument inutilisable. Aussi, avons-nous essayé de faire des mesures à l'aide d'électrodes plongeant constamment dans le milieu.

Les mesures se sont révélées plus intéressantes, mais plusieurs phénomènes perturbateurs ont été entrevus, notamment :

L'agitation. — Déjà, avec la cuve précédente, le courant d'azote fait remonter brutalement le potentiel à une valeur très différente (+ 150 + 200 mv) ; l'élévation du *p*H est au contraire lente.

Dans le cas des cuves closes, la simple agitation fait remonter le potentiel, et encore ici il faut attendre deux ou trois heures pour voir le potentiel se stabiliser.

Dans ces conditions, toutes les cultures ont été faites sans billes et les cuves entièrement remplies.

La polarisation des électrodes. — Les fiches d'électrodes ne doivent jamais rester sans protections si on fait des mesures point par point. En effet, on peut, par inadvertance, mettre à la terre les deux électrodes ou les courcircuiter d'une façon quelconque. Il se produira alors un court-circuit entre les deux électrodes et une polarisation éventuelle de l'électrode de Pt. Là aussi, le retour à l'équilibre est très lent.

Les mesures de potentiel point par point sont donc extrêmement délicates avec un matériel courant. Aussi, avons-nous fait des enregistrements : les mesures deviennent alors valables.

2° *Enregistrement*

Il est donc pratiquement impossible de faire une étude des variations des potentiels de platine si l'on ne fait pas un enregistrement constant, sans perturbation provoquée par déplacement d'électrodes ou mouvements dans le milieu de culture.

C'est pour se placer dans des conditions identiques que nous avons utilisé le deuxième procédé de numération, au cours duquel les tubes (tubes à centrifuger coniques, de 10 ml) ne sont jamais agités (on se rend alors compte que l'agitation ne modifie pas sensiblement le développement, comme Gelperin l'a montré). Un prélèvement minimum avant la centrifugation permet l'examen de la culture vivante.

Deux systèmes enregistreurs ont dû être employés. Chacun ne permet qu'une seule étude à la fois. Donc, le cycle d'une culture variant de quinze jours à un mois et demi, suivant la vitesse de développement, ce travail doit s'étaler sur un temps très long. C'est en particulier dans ces conditions qu'une souche régulière, dont on peut fixer la phase maximale de façon précise, a été particulièrement utile (p. 100 G $\leqslant$ 20 p. 100).

a) *Cuves.* — Nous inspirant des travaux de Piffault, Blanquet, Quéré et Arnaud [50] sur les *p*H et potentiels sanguins, nous avons d'abord songé à employer une micro-cuve de constitution voisine, sans jaquette thermostatique, cette cuve étant placée dans une petite étuve à 37°. Elle permet de faire des enregistrements sur de petites quantités de liquide, le remplissage se faisant par aspiration. Mais ce procédé se révéla peu pratique malgré l'intérêt que présentaient les rodages (fig. 17, 2).

Une autre cuve fut alors essayée. Son remplissage en est plus aisé et sa capacité plus grande. Pendant la culture, elle est placée dans une étuve à 37°. Elle permet l'addition de la culture au moment désiré (fig. 17, 3).

Mais la pose des électrodes est beaucoup plus délicate. C'est ce procédé qui nous a fourni le plus grand nombre d'enregistrements corrects, la petite cuve restant intéressante pour des mesures simples ne demandant que deux à trois heures sur des milieux qui n'évoluent pas.

Remarque. — Une des grandes cuves possédait deux électrodes inertes de Pt poli (fig. 17, 4) : une inférieure, une supérieure.

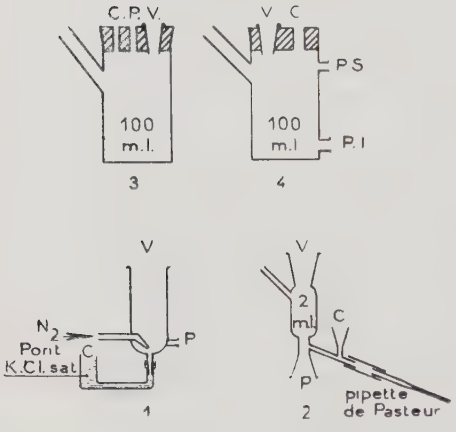


Fig. 17.

Schéma des diverses cuves employées.
C : emplacement électrode au calomel.
P : — — au platine.
V : — — au verre.

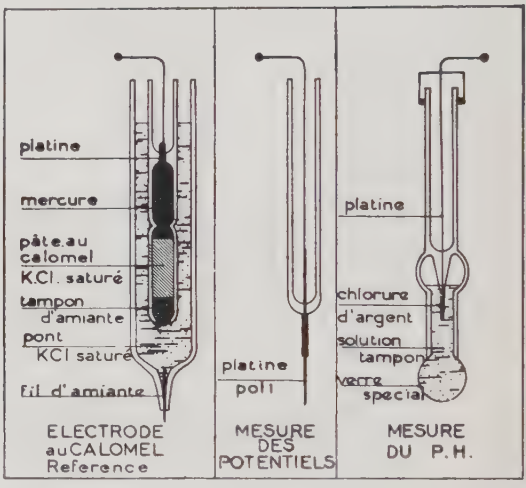


Fig. 18.

Schéma des électrodes employées.

En effet, les premiers stades cultivant en décantation, on pouvait se demander si cela entraînerait des différences entre les électrodes par création d'une sorte de gradient de potentiel dans le milieu.

b) *Les électrodes* (fig. 18) :

Electrode de verre. – Electrodes de type classique remplies soit à *p*H 3, soit à *p*H 7 suivant le dispositif de

mesure. L'étalonnage a été fait avant chaque repiquage, à l'aide de tampons 7 portés à 37°.

La stérilisation de ces électrodes se fait juste avant leur introduction verticale dans l'alcool, à l'aide d'un jet d'alcool-éther, puis d'éther.

Les électrodes de platine poli doivent être portées au rouge; avant de les poser il faut éviter, pour cette opération, les sources qui charbonnent.

Nous avons employé une lampe à alcool éthylique.

L'électrode de référence (électrode au calomel) est mise en relation avec le milieu par l'intermédiaire d'un pont en amiante imbibé de KCl, suffisamment long pour éviter une trop rapide diffusion.

La pile au calomel baigne dans une solution saturée de ClK.

c) *Dispositif de mesure.* — Entre l'électrode de verre ou l'électrode de platine et l'électrode au calomel, il apparaît une différence de potentiel qui s'exprime en mv (et plus couramment en unité *p*H pour l'électrode de verre).

Ces différences de potentiel sont soumises :

— Soit à un voltamètre à lampe très stable dont la sortie extérieure attaque un convertisseur de mesure CUG II, solidaire d'un enregistrement à plume : 0-4 mA.

Le procédé de mesure est équivalent à celui des potentiomètres de zéro. La compensation automatique de la tension mesurée est réalisée à l'aide d'un élément à cadre mobile très sensible. Il permet l'enregistrement de toute grandeur, susceptible d'être traduite en différence de potentiel. Les auteurs font une description détaillée de ce procédé [50].

— Soit à un potentiomètre enregisteur (*).

Possédant une très grande résistance d'entrée des circuits, il permet l'utilisation directe des électrodes de verre.

(*) « Titromatic » de M. Quéré, rue Cousin, à Bordeaux.

Nous tenons à remercier M. Quéré pour toute l'aide technique et théorique qu'il a bien voulu nous fournir au cours de cette étude.

Les mesures se font par une méthode d'opposition automatique, avec contrôle permanent du potentiel étalon. L'inscription des potentiels variables se fait sur une feuille de format 220 × 275 mm, se déplaçant de 1 cm par heure. La feuille est donc changée tous les jours, le zéro est contrôlé et recadré pour chaque feuille. Une micro-étuve spéciale a été construite pour ces enregistrements.

Elle consiste en un polyèdre, à base rectangulaire en métal, peint en noir, immergé dans un bain d'huile de vaseline à 38°, température intérieure constante de 37°, et recouvert de deux plaques en contreplaqué épais juxtaposables et laissant passer les électrodes.

Afin d'éviter toute polarisation des électrodes de platine, les prélèvements sont faits sur l'appareil lui-même, les fiches restant en place (seules perturbations : remontée du potentiel par agitation). Les mesures à l'aide de cet appareil sont directes; l'erreur est toujours inférieure à plus ou moins 2 mv.

Dans ces conditions, les variations deviennent significatives.

C. — Résultats

Variations du pH :

Chute constante pour atteindre un minimum stable d'environ 6,0 unités à *p*H (fig. 19).

Si l'on attend suffisamment, le *p*H remonte vers la zone alcaline. Nous pensons qu'il s'agit là d'un équilibre entre la production de déchets métaboliques volatils (CO_2 en particulier) et la diffusion à l'extérieur de ces déchets. Pendant la phase active, la production est abondante, puis elle diminue progressivement.

Lorsque la culture est morte, seule la diffusion se produit.

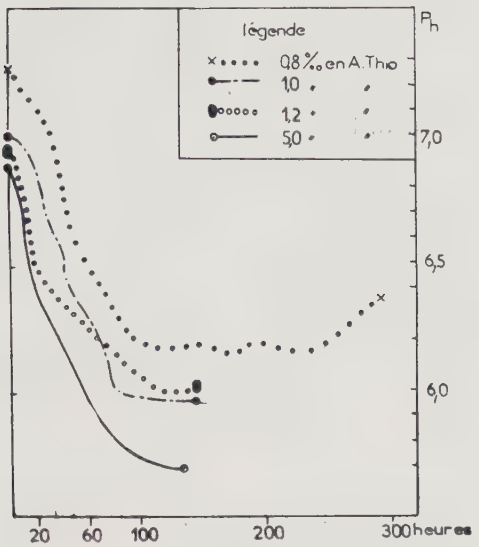


Fig. 19.

Variation du *p*H lors de cultures en milieu V. F. contenant différentes concentrations d'acide thioglycollique neutralisé.

Il est intéressant, à ce sujet, de comparer (fig. 16) :

— Courbe *p*H VF 1 p. 1.000 ATG *à l'air;*

— Courbe *p*H VF 1 p. 1.000 ATG *sous azote;*

— Courbe *p*H VF 1 p. 1.000 ATG *en vase clos.*

La vitesse de chute semble liée à la vitesse de pousse, ce qui est tout à fait normal.

Cependant, on constate que, *d'une part,* toutes les courbes, même pour les développements lents, s'arrêtent à 6,0 environ, et que, *d'autre part,* si on confronte avec les courbes de numération, on remarque que la chute de *p*H se produit toujours dans la première phase du développement, au moment où le pourcentage granulaire est encore important.

La phase atypique granulaire se caractérise par un métabolisme intense.

Variation du potentiel (fig. 20) :

L'allure générale est toujours identique :

— Une première chute jusqu'à un potentiel — 520, donc une réduction du milieu;

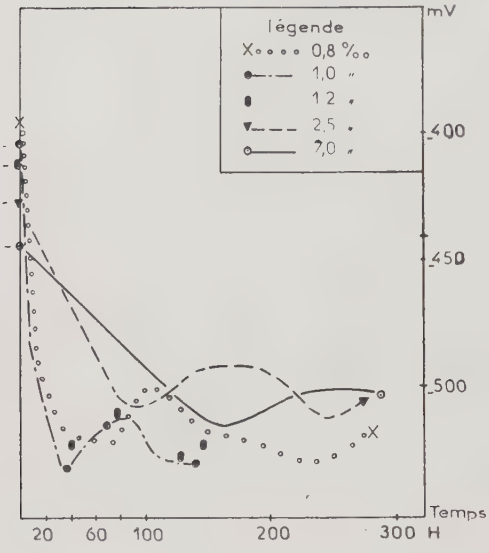


Fig. 20.

Fig. 20. — Variations du potentiel de platine lors de premiers passages sur milieu V. F. contenant différentes concentrations d'acide thioglycollique neutralisé. - Les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode au calomel.

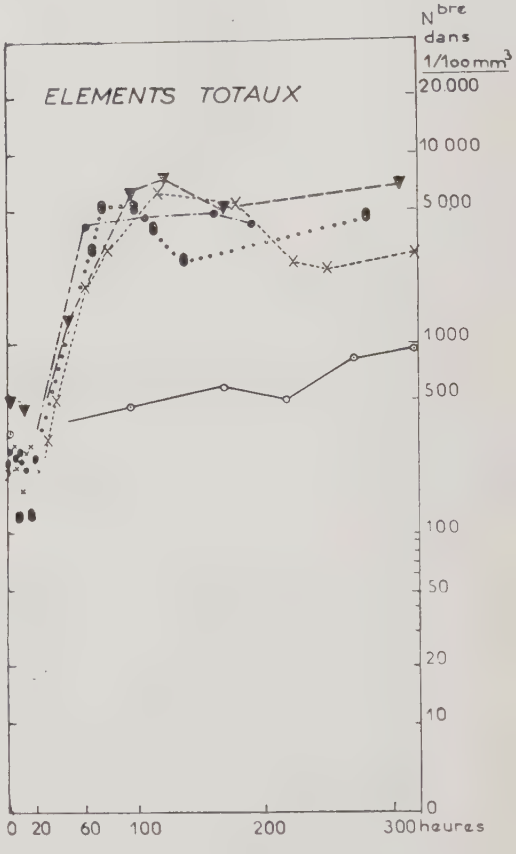


Fig. 21.

Fig. 21. — Variations du nombre d'éléments totaux lors de premiers passages sur milieu V. F. contenant différentes concentrations d'acide thioglycollique neutralisé. (Même méthode de numération. - Echelle semi-logarithmique.)

— Une remontée plus ou moins accentuée, variant de 20 à 30 mv;

— Puis une deuxième chute lente du potentiel jusqu'aux environs du premier minima;

— Enfin, une remontée lente lorsque la culture meurt.

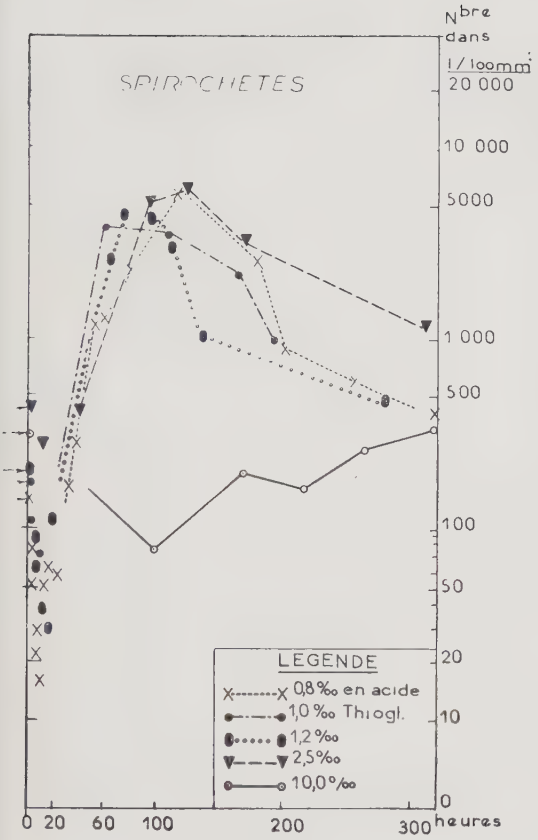


Fig. 22.

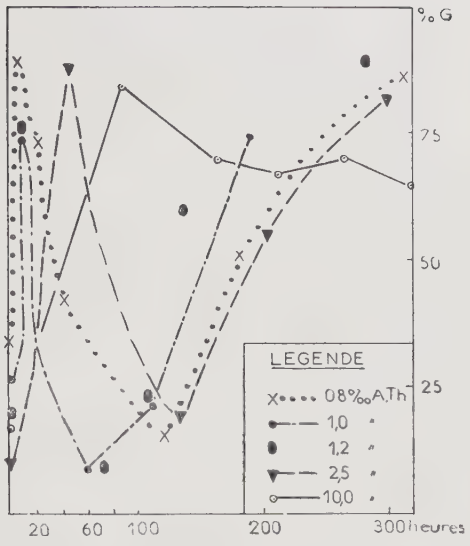


Fig. 23.

Fig. 22. — Variations du nombre d'éléments spiralés lors de premiers passages sur milieu V. F. contenant différentes concentrations d'acide thioglycollique neutralisé. (Même méthode de numération. - Echelle semi-logarithmique.)

Fig. 23. — Variations du pourcentage en formes atypiques lors de premiers passages sur milieu V. F. contenant différentes concentrations d'acide thioglycollique neutralisé. (Méthode de numération par centrifugation préalable des cultures.)

L'allure particulière de chaque courbe est également à considérer. Elle est liée à la vitesse de pousse et de façon bien plus nette que les variations du *p*H (voir tableau II, p. 73).

On est donc amené à comparer les modes de développement et les courbes de potentiel.

On peut diviser ces variations de potentiel en trois phases. Or, si l'on considère les *courbes numériques* (fig. 21 et 22), d'une part, les *courbes de pourcentage* (fig. 23), d'autre part,

on peut également diviser le développement en trois phases. Ces phases concordent-elles ?

Les numérations effectuées sur des culots de culture permettent d'étudier le développement dès les premières

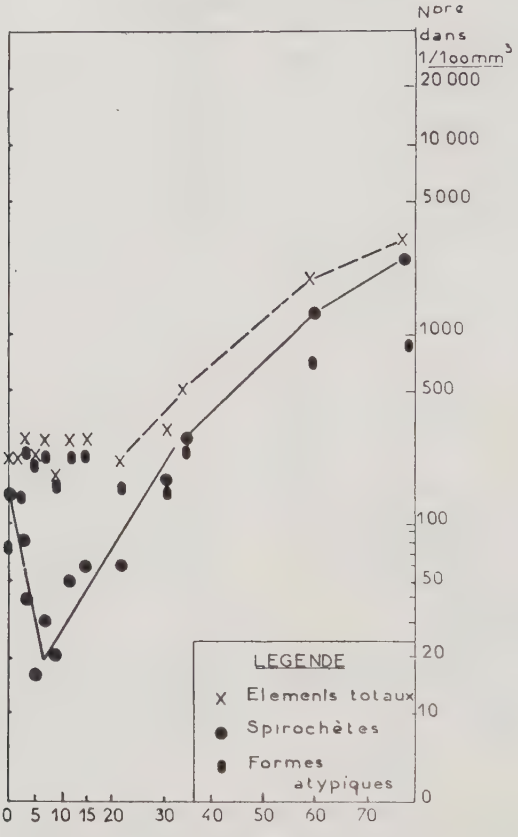


Fig. 24.

Détail des premières numérations effectuées sur la culture en milieu V. F. contenant 0,8 p. 1.000 d'acide thioglycollique neutralisé. Echelle semi-logarithmique.

heures, on retrouve et confirme les premiers résultats décrits au chapitre précédent. L'étude a porté sur cinq concentrations différentes en réducteur, et on distingue :

— Les cultures dans des milieux contenant des quan-

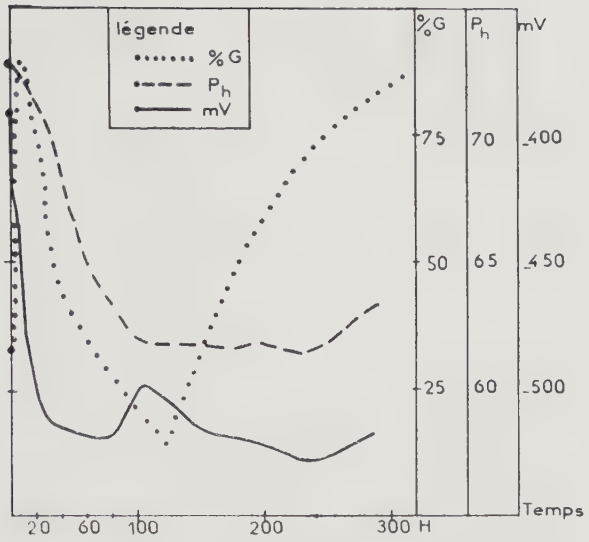


Fig. 25.

Confrontation entre les variations du p*H*, du potentiel de platine et du pourcentage en formes atypiques pour la culture en milieu V. F. contenant 0,8 p. 1.000 d'acide thioglycollique neutralisé.

tités de réducteur supérieures à 1,2 p. 1.000 : 2,5 p. 1.000, 5 p. 1.000, dont la vitesse de développement est faible;

— Les cultures à développement rapide : 1 et 1,2 p. 1.000;

— La culture en milieu contenant 0,8 p. 1.000 d'acide thioglycollique à développement plus lent.

Mais l'utilisation de ce procédé apporte trois faits importants :

Le nombre des éléments totaux reste constant pendant les premières heures (fig. 22), alors que le nombre de formes spiralées décroît tout d'abord puis augmente progressivement (fig. 21). Enfin, le nombre de formes atypiques s'accroît toujours dès le début des cultures. Il y a transformation des éléments spiralés en éléments atypiques dans les toutes premières heures de culture. Un étale-

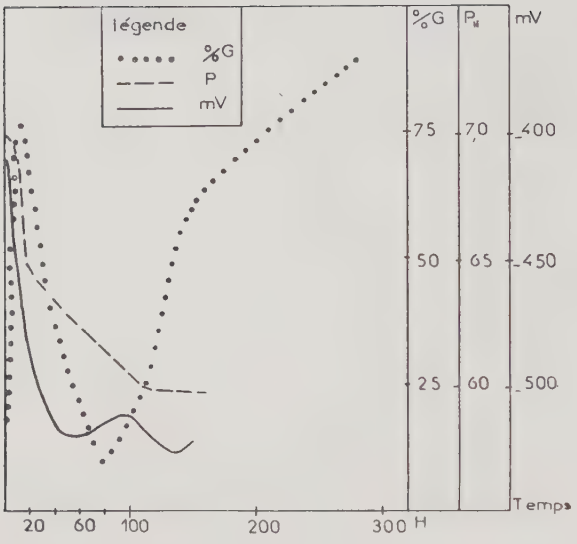


Fig. 26.

Confrontation entre les variations du p*H*, du potentiel de platine et du pourcentage en formes atypiques pour la culture en milieu V. F. contenant 1,2 p. 1.000 d'acide thioglycollique neutralisé.

ment de l'échelle des temps, pour un exemple particulier, met très nettement ce phénomène en valeur (fig. 24).

L'étude des variations du pourcentage en formes atypiques est intéressante également car elle confirme nos résultats antérieurs (fig. 20). Les mêmes variations générales sont notées, mais l'allure et l'amplitude de ces variations dépendent de la concentration en réducteur. Pour les concentrations de 1 p. 1.000 et 1,2 p. 1.000 en acide thioglycollique, les variations sont rapides, le minimum est de 10 à 15 p. 100. Pour les hautes concentrations, ce minimum est élevé, difficile à fixer dans le temps. Les valeurs numériques obtenues pour diverses concentrations en acide thioglycollique sont données au tableau III, p. 74.

Confrontons les résultats :

Tout d'abord, on constate que les phases physico-chimiques et morphologiques concordent en général assez exactement, comme le montrent les figures 25 et 26.

La phase à prédominance granulaire correspond à la phase de réduction.

La phase d'expansion spirochétienne (p. 100 G ≦ 20 à 25 p. 100) correspond à un clocher de potentiel plus ou moins significatif (20 à 40 mv).

La phase de retour à la forme atypique correspond à une nouvelle et légère réduction du milieu jusqu'à ce que la culture meure. L'oxygène de l'air engendre alors une remontée du potentiel de platine, par diffusion.

La vitesse de développement, influencée par la concentration en réducteur, se traduit donc par une donnée physico-chimique délicate. Les figures 25 et 26 sont particulièrement significatives à ce sujet.

Enfin, signalons que le potentiel de platine chute le plus intensément alors que le nombre d'éléments totaux reste

TABLEAU II

Considérations sur les potentiels.

Concent. en acide thioglyc. (p. 100)	Minimum	Pente de 0 a 10 h.	Pente de 0 a 20 h.	Remontée après	Temps pour arriver a 500	Chute de potentiel totale
0,8	520	95 mv	126 mv	70 h. à 75 h.	13 h.	115 mv
1	530	80 mv	105 mv	40 h. à 45 h.	18 h.	130 mv
1,2	520	75 mv	90 mv	55 h. à 60 h.	21 h.	110 mv
2,5	505	10 mv	20 mv	100 h. à 105 h.	75 h.	80 mv
5	515	5 mv	10 mv	140 h. à 145 h.	110 h.	75 mv
Extrapolation		0	0	Pas de remontée	0	0

TABLEAU III

POURCENTAGE G : PRINCIPAUX POINTS.

CONCENTRATION EN ACIDE THIOGLYCOLLATE	MAXIMUM		MINIMUM	
	TEMPS	VALEUR	TEMPS	VALEUR
0,8	10 à 20 h.	90 p. 100	100 - 110	15-20 p. 100
1	6 à 10 h.	80 —	60 - 70	9-10 —
1,2	10 à 15 h.	75 —	70 - 80	10-15 —
2,5	40 à 50 h.	75 —	110 - 120	20-25 —
5	70 à 80 h.	80 —	300 - 400	35-40 —
10	env. 90 h.	85 —	indéfini	60-65 —

constant. La transformation des éléments spiralés en éléments atypiques granulaires est donc un phénomène actif nécessitant de l'énergie que les organismes prélèvent sur le milieu en le catabolysant.

Discussion :

Les variations du potentiel de platine ne sont pas des entités. Elles expriment le degré de réduction ou d'oxydation du milieu soumis aux micro-organismes, le stade de l'équilibre dynamique entre les enzymes et les constituants du milieu. Les variations obtenues ici se retrouvent très généralement, tout au moins pour cette chute de potentiel initiale, dans les cultures de nombreuses bactéries, comme le montre HEWITT [30]. Cette variation, inexplicable par la simple variation du *p*H, est spécifique des phases de latence et des phases de développement logarithmique.

Comme on peut le constater à l'aide de l'indicateur coloré, les premières heures de culture provoquent une forte réduction des milieux (Resazurine : rose → jaune paille). On attribue ce phénomène à l'utilisation par l'organisme de l'oxygène dissous dans le milieu, ou à la

saturation des accepteurs d'hydrogène. Ainsi, comme le dit Hewitt, « la bactérie jette des flots de réducteurs comme la sèche son encre ».

Dans notre cas particulier, l'ensemble des courbes montre bien que la réduction du milieu est due à la phase granulaire. Si on influe sur la durée de cette phase, la pente de la chute de potentiel varie en conséquence.

Le réducteur agit-il sur certains mécanismes de division nucléaire retardant l'apparition de la phase spiralée ?

— La valeur initiale du potentiel de platine a certainement un intérêt, mais elle est difficile à fixer et à reproduire de façon déterminée.

De grandes limites peuvent être envisagées. Les spirochètes sont des anaérobies strictes : en milieu VF sans réducteur (potentiel de platine + 100 à + 150 mv), aucun développement ne se produit. Il en est de même pour les milieux trop vieux ou non régénérés.

Nous pensons, comme Hewitt, que les anaérobies ne peuvent réduire que des milieux de potentiel : — 100 à — 200 mv au maximum. « Une explication raisonnable semble être que le pouvoir réducteur des bactéries dépend des enzymes qu'ils peuvent produire. Les anaérobies n'auraient que des enzymes catalysant des réactions sous des conditions réductrices intenses. Les anaérobies n'ont pas une panoplie suffisante d'enzyme : ils sont déficients en cytochrome et en système utilisateur d'oxygène. »

Ainsi, le fait de diminuer la concentration en réducteur en dessous d'une valeur optima, donc d'augmenter le potentiel initial, explique peut-être cette diminution de la vitesse de développement. Et il doit exister une concentration limite en réducteur. C'est ainsi que l'on pourrait expliquer certains travaux, tels ceux de Eagle sur la cystéine.

— Le but de cette étude était plus simple.

Nous cherchions à connaître l'influence des phases de développement sur les milieux.

C'est ainsi que la phase granulaire se montre originale. Aussi bien au début qu'en fin de culture, elle réduit le milieu s'opposant à la phase spiralée dont la répercussion physico-chimique est beaucoup plus discrète (le grand pouvoir réducteur des phases granulaires a déjà été signalé par le B. K. par Sterzl [58].

Etant donné l'analogie qui peut exister entre les phases de latence chez les bactéries et cette phase granulaire chez le spirochète, on peut se demander si ces variations caractéristiques n'expriment pas des métabolismes différents. En effet, la phase de latence se traduit, chez les bactéries, par un enrichissement en acide nucléique, et la phase d'expansion par la synthèse de protéines banales.

IV. — VALEUR OU POTENTIALITÉ BIOLOGIQUE DES FORMES SPIRALÉES OU ATYPIQUES

Les études antérieures ont permis de mettre en évidence une suite de variations morphologiques caractéristiques, ce qui pourrait constituer un cycle biologique, et de montrer quelle est l'influence de ce cycle sur le milieu.

Cependant, les différents auteurs ne considèrent ces formes granuleuses ou rondes que comme la manifestation d'une « involution », d'une « souffrance », d'une « résistance » des organismes à l'égard d'un milieu épuisé ou inadéquat. Il est donc permis de se demander quelle est la valeur biologique de ces formes.

En effet, si ce sont des formes de souffrance, leur repiquage ne donnera que de lentes subcultures.

Au contraire, si elles représentent une phase de haute reproductivité, on aura une subculture rapide et un bon rendement.

Nous avons donc essayé de comparer les qualités d'inoculats, les quantités étant déterminées, afin de comparer les comportements au repiquage, d'une part des tréponèmes, d'autre part des formes granulaires.

A. — Matériel spirochétien

Tréponèmes. — Il est possible d'obtenir la forme spiralée à peu près pure (90 p. 100).

Formes granulaires. — On sait que, dans un développement normal, la phase granulaire passe par un premier maximum puis ne réapparaît qu'en fin de culture.

Les formes granulaires finales seraient faciles à obtenir mais ce sont des formes qui, dans un milieu usé, dégénèrent progressivement et meurent.

Leur basophilie décroît, c'est-à-dire qu'il se fait une autolyse plus ou moins importante si l'on attend la transformation de la culture à 90 p. 100 en formes granulaires. On ne peut déterminer les formes encore vivantes.

Aussi, est-on obligé d'utiliser des pourcentages inférieurs ou d'employer un artifice.

On a vu que, dans du bouillon VF à 10 p. 100, on ne retrouve pratiquement que des formes granulaires après trois à quatre jours. Aussi, a-t-on confronté des souches suivant le schéma :

Brewer —→ Brewer
↓ ←— formes spiralées..... 90 p. 100
↑ Brewer
↓ ←— formes granulaires ... 70 p. 100
Brewer —→ VF : 10 p. 1.000 d'acide thioglycollique.

Le tableau IV (p. 79) montre qu'un inoculum contenant un taux élevé de spirochètes ne donne pas forcément un développement rapide. Ainsi, une culture possédant au repiquage 180 spirochètes pour 1/100 de mm, se développe moins vite qu'une culture n'en possédant que 18. Si deux milieux contiennent en début de culture un nombre égal d'éléments mais avec des pourcentages en formes atypiques différents, c'est le milieu le plus riche en formes atypiques

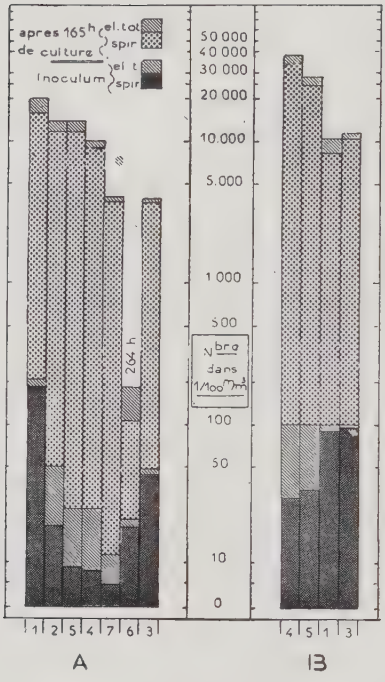


Fig. 27.

Influence de la quantité et de la composition de l'inoculum sur le développement en milieu Brewer.

A : nombre d'éléments obtenus après 165 heures de culture;

B : rendement de culture après 165 heures.

Les chiffres notés en abscisse indiquent la correspondance avec le tableau IV, p. 79.

qui se développe le plus vite (fig. 27).

Une forme atypique est, en somme, équivalente à un nombre plus ou moins grand de spirochètes. La phase dans laquelle se trouve la forme atypique est également à considérer. L'équivalence 1 forme atypique = x spirochètes, varie suivant que l'on s'adresse à la phase préloga-

TABLEAU IV

Etude sur la valeur biologique des éléments spiralés et granulaires (Potentialité des formes).

Temps (en h.)	1					2				
	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S
Départ	28	180	208	13	87	32	18	50	65	35
100 h.	280	8.400	8.700	25	75	2.000	12.000	14.000	14,5	85,5
165 h.	4.000	16.000	20.600	20	80	3.300	8.700	12.000	28	72

	3					4				
	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S
Départ	4	44	48	8	92	17	8	25	70	30
100 h.	200	2.000	2.200	9	91	300	260	2.900	10	90
165 h.	400	5.800	6.200	6,4	93,6	750	9.100	9.850	7,5	92,5

	5					6				
	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S
Départ	16	9	25	65	35	3	18	21	13	87
100 h.	350	7.500	11.000	16	84	»	phase granulaire longue : après 264 h.			»
165 h.	2.500	12.000	14.500	18	82	600	1.140	1.800	36	64

	7					8				
	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S	G	S	T	p. 100 G	p. 100 S
Départ	8	4	12	70	30	0,1	1	1,1	8	92
100 h.	300	300	600	50	50	»	»	»	»	»
165 h.	100	3.800	3.900	3	97	»	tout transf. en formes rondes			»

G : nombre de formes atypiques pour 1/100 mm³;
S : nombre de spirochètes pour 1/100 mm³;
T : nombre d'éléments totaux pour 1/100 mm³;
p. 100 G : pourcentage des formes atypiques;
p. 100 S : pourcentage des formes spiralées.

rithmique (haute potentialité) ou à la phase postlogarithmique (potentialité décroissante).

C'est ainsi que l'on peut comprendre les paradoxes rencontrés au premier chapitre : sur milieu Brewer ou milieu VF - acide thioglycollique. Dans le cas du milieu Brewer, nous avons vu qu'au sixième repiquage le milieu ne contient que 150 éléments au 1/100 mm^3, alors qu'au septième repiquage le milieu en contient 400. Cependant, le développement a été très rapide au sixième repiquage. Dans le premier cas, il y a 50 p. 100 de formes atypiques au début de la culture; dans le second, il n'y en a que 25 p. 100.

En étudiant la vitesse de développement au deuxième passage sur milieu VF - acide thioglycollique, nous nous sommes heurté à un problème similaire qui désormais s'explique plus clairement. En effet, les inoculats provenant de milieux à 7, 8, 9, 10 p. 1.000 de thioglycollate, apportent un nombre important de formes atypiques, mais peu de formes spiralées; c'est l'inverse pour les inoculats provenant de milieux à 3, 5, 6 p. 1.000 en thioglycollate. Là encore, les milieux contenant le plus grand nombre de formes atypiques au début de la culture, présentent le développement le plus rapide.

Dans un repiquage, il faut toujours tenir compte de l'inoculum : de sa teneur en éléments totaux, de son pourcentage en formes atypiques, de la phase à laquelle se trouve la culture qui l'a fourni.

B. — Souillure des milieux

Après un enregistrement de potentiel, la culture VF 2,5 p. 1.000 acide thioglycollique fut souillée fortuitement et, après une quinzaine de jours, on a constaté un voile bactérien en surface.

Le prélèvement confirme ce résultat mais on ne retrouve plus de formes annulaires et rondes.

Le germe est isolé et entretenu sur gélose aérobie et sur milieu anaérobie (milieu Brewer). C'est une coccie aérobie Gram (positif).

Partant de cette souche, l'expérience a été reprise cinq fois sur des cultures vieilles en milieu Brewer. Le phénomène a été reproduit trois fois sur cinq.

Les deux échecs portent sur des cultures contenant 80 p. 100 de formes rondes (donc très vieilles).

Les expériences réussies donnent les résultats suivants :

— Les formes rondes ne disparaissent pas totalement;

— Il y a apparition de formes germinatives.

Il y a deux sortes de spirochètes :

— Des spirochètes élargis, immobiles, dont le nombre correspond à celui que l'on avait au moment de la souillure;

— Des spirochètes fins, très vivaces, normaux.

Le phénomène ne se produit pas tout de suite, mais après un certain temps de latence.

Le cycle est donc réalisé dans le milieu même, pourtant usé.

Comment agit la bactérie ?

En effet, si les milieux sont souillés, même légèrement, au début des cultures, il n'y a pas de développement. Il s'agit en fait d'un équilibre biologique.

Si les bactéries se trouvent en phase logarithmique avant les spirochètes, ces derniers meurent (sous formes rondes).

Si les bactéries se développent sur un milieu riche en formes tréponémiques, il peut se produire un autre phénomène.

En principe, la transformation pourrait être provoquée soit par un produit de métabolisme bactérien, soit par une influence purement physico-chimique.

On a vu que tout développement de micro-organisme provoque d'abord une chute de potentiel (réduction), puis une remontée plus ou moins rapide de ce potentiel.

La bactérie agit-elle au premier ou au deuxième stade ?

En ajoutant des réducteurs : cystéine, acide thioglycollique, vitamine C, vitamines C et PP, aucun changement ne se produit.

Pour contrôler à quel stade la bactérie pourrait agir, nous avons essayé d'opérer sur les cuves dont on enregistrait le potentiel. On peut donc voir s'il s'agit d'un produit du métabolisme ou simplement d'une influence sur le potentiel. Le procédé permet en même temps de faire des numérations.

Lorsque le potentiel retombe à — 530 mv, soit après la phase d'expansion logarithmique spirochétienne, l'électrode de verre est remplacée par un tube de collodion, monté sur tube de verre, de diamètre égal, l'ensemble ayant été stérilisé à l'autoclave.

Après avoir été posé, on remplit ce tube de milieu nutritif (Institut Pasteur).

Enfin, la souillure est inoculée.

Malheureusement, le milieu VF a été souillé par du *B. subtilis* qui se montre particulièrement toxique pour notre tréponème.

Nous ne pouvons donc donner encore de conclusions sur ce phénomène.

Quoi qu'il en soit, les formes dites « involutives » redonnent la forme spiralée, non seulement dans des milieux neufs, mais aussi sur des milieux usés. Leur « potentialité » se placerait entre la forme granulaire initiale et la forme spiralée dont il faut remarquer la discrétion au cours des repiquages.

Cette forme granulaire n'est donc pas une forme « involutive », au contraire, elle est à l'origine de l'expansion spirochétienne future, si elle se trouve dans des conditions physico-chimiques propres à cette expansion.

V. — ANALYSE CYTOCHIMIQUE DES FORMES

Etant donné les critères morphologiques au microscope à contraste de phase,

Etant donné l'analogie existant dans l'étude des potentiels de culture entre les phases primaire, bactérienne et spirochétienne,

Etant donné enfin la haute valeur au repiquage des formes granulaires,

Nous avons été tout naturellement amené à envisager l'étude cytochimique de ces formes.

Comment se pose le problème dans notre cas particulier ?

Nous avons montré qu'il existait un cycle, c'est-à-dire une suite de phases de reproduction ou un mode de développement particulier, débutant toujours par un phénomène de granulation et bourgeonnement.

Au microscope à contraste de phase, nous avons décrit ces formes diverses et leur hétérogénéité.

Reprenant les travaux effectués sur les bactéries, nous pouvions imaginer que ces formes rencontrées avaient la même signification biologique que chez les bactéries : gonflement et division nucléaire sans division cytoplasmique (comme cela se produit chez le colibacille cocci Gram positif et négatif [61], chez les bacilles entériques [42] et chez les bactéries anaérobies [43]), puis apparition de la forme spiralée d'expansion.

Aussi, avons-nous pensé que l'hétérogénéité constatée au microscope à contraste de phase pouvait être due, dans le cas des formes granulaires, à un appareil nucléaire.

Tulasne [59-60], d'ailleurs, a pu, par ce procédé, décrire l'appareil nucléaire bactérien.

Pour les formes spiralées, le corps spirochétien étant très long et très fin, le noyau devient inapparent. Il est :

— *Ou* rond, comme chez les bactéries, mais alors il est minuscule et il conviendra de le situer,

— *Ou* allongé et en spirale, ce qui semblerait plus exact, si l'on considère le rôle important du noyau dans les synthèses et les échanges nucléoplasmatiques. Le rapport surface nucléaire à surface cytoplasmique serait ainsi homogène.

Pour contrôler ces hypothèses, il fallait choisir un matériel adéquat. L'étude du cycle par examens microscopiques de lames colorées selon notre technique, montre que, malgré les déformations entraînées par l'étalement et la dessiccation, on peut homologuer les diverses formes rencontrées (fig. 28).

Début de développement :

Les formes vésiculaires les plus grosses nous ont paru extrêmement fragiles, même après fixation au sérum physiologique phéniqué.

Elles s'étalent totalement et éclatent. On distingue un cytoplasme diffus, irrégulier, avec des points très basophiles. Mais on est loin des belles images obtenues au microscope à contraste de phase.

Les plus petites formes vésiculaires peuvent rester intègres, si ce n'est quelques simples déformations. Les granules prennent très fortement le colorant et on voit mal la structure interne.

Les formes germinatives sont, par contre, beaucoup plus détaillées qu'au microscope à contraste de phase. Elles aussi sont déformées, mais leur structure reste caractéristique : enroulement en larges spirales, fuite de ces spirales en une tresse très serrée à un ou deux pôles de la forme ronde, le tout est entouré d'une membrane très fine.

Fin de développement :

La basophilie est très affaiblie. Mais la structure des formes annulaires et des formes rondes est identique à celle du début de développement. Il faut surcolorer à la fuchsine. Elles sont difficiles à photographier (coloration

rose-pâle). On ne constate pas de formes germinatives.

La basophilie et l'absence de formes germinatives sont donc les deux grandes différences.

La basophilie des éléments passe ainsi par un maximum situé au début de la culture. Mais elle n'est pas due à un élément quelconque : ce sont les formes atypiques, granules en particulier, qui la possèdent au plus haut degré.

Là encore, on rejoint les observations faites sur diverses bactéries (Boivin [5], Boivin et Vendrely [6]).

Cette basophilie est due à l'acide ribonucléique, particulièrement abondant dans les premiers stades du développement et qui jouerait un grand rôle dans la synthèse des protéines, selon Caspersson.

Cet ensemble de faits convergents et le grand nombre d'analogies entre les bactéries et nos organismes posent, sur des bases plus solides, l'hypothèse d'un noyau visible à la phase granulaire. Et le microscope à contraste de phase en permet peut-être l'observation directe sur l'élément vivant.

Les principales méthodes d'étude du noyau bactérien consistent en :

1° *Méthodes physiques :*

Microspectrophotographie en ultra-violets : le spectre d'absorption des acides nucléiques (noyau particulier) passe par un maximum à 2.600 Å, donc différent des protéines (méthode de Caspersson).

2° *Méthodes cytochimiques :*

a) *Réaction nucléaire de Feulgen :* réaction du désoxyribose;

b) *Technique de Robinow :* hydrolyse chimique des ribonucléoprotéines;

c) *Technique de Boivin, Vendrely et Tulasne :* hydrolyse enzymatique des ribonucléoprotéines.

Dans ces deux dernières, le noyau à désoxyribose n'est

pas touché, si l'action enzymatique n'est pas trop prolongée. Sinon, « il se produit un effet non spécifique de lixiviation sur l'acide désoxyribonucléique [5] ».

La spécificité enzymatique, la nouveauté du matériel que nous allions utiliser nous ont décidé à employer la ribonucléase (*).

Mais il restait à fixer :

— La phase de développement à utiliser pour ces réactions;

— Les constantes température-temps pour la réaction enzymatique.

La solution de ribonucléase ne peut être employée qu'en petite quantité. Il faut donc réduire la surface des frottis. De plus, on a intérêt à augmenter le plus possible le nombre de formes par champ microscopique.

On a donc utilisé des culots de centrifugation de cultures tuées puis reprises avec un peu d'eau distillée.

II gouttes sont déposées séparément sur une même lame et sont évaporées à douce chaleur. L'un des frottis sert de témoin.

Le stade de développement le plus intéressant étant la première phase, les premiers essais ont porté sur des cultures en milieu Brewer, à gros inoculum, de douze heures et de vingt-quatre heures.

La solution de ribonucléase était à 1 mg/ml.

Malgré plusieurs essais à différentes températures et pour des durées d'hydrolyse différentes, les résultats ne furent pas satisfaisants.

La basophilie de la préparation diminue rapidement, mais le nombre des spirochètes est trop important. Aussi, distingue-t-on mal les formes granulaires et les formes germinatives.

(*) L'échantillon avec lequel nous avons travaillé nous a été donné par M. R. Vendrely. Nous tenons à remercier M. et Mme Vendrely de l'accueil qu'ils nous ont réservé dans leur Laboratoire.

Nous avons donc pris un matériel d'étude plus pratique : une culture à développement lent, où l'équilibre des phases est en faveur de la première phase granulaire, cherchant ensuite à étendre les notions acquises au développement normal.

Finalement, nous avons opéré comme suit :

Préparation des frottis :

Culture à développement lent, jeune ou très jeune, centrifugée à 2.000 tours;

Reprise du culot par un peu d'eau distillée stérile;

Etalement immédiat d'une goutte sur lame propre;

Séchage rapide sur platine chauffante à 40°;

Fixation au Carnoy pendant quinze minutes, puis à l'alcool absolu;

Séchage;

Coloration pendant deux minutes au bleu de toluidine phéniqué R. A. L.;

Repérage sur lame des éléments à étudier;

Décoloration à l'alcool puis, très rapidement, à l'acide nitrique dilué au 1/20; lavage immédiat à l'eau distillée;

Séchage.

Action de la ribonucléase à 37° :

Une demi-heure en enceinte humide (boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'un papier filtre humide).

Pour éviter toute évaporation, nous avons fabriqué de petites plaques de verre à bords recourbés et rodés. La solution est retenue par capillarité, l'action est homogène.

Après hydrolyse enzymatique, lavage et séchage, la lame est recolorée rapidement (deux minutes) par le bleu de toluidine, et les endroits repérés sont, autant qu'il est possible, à nouveau examinés. Si l'on désire mettre en évidence de façon plus contrastée le cytoplasme, on peut surcolorer par le Zielh dilué au 1/20 pendant quelques secondes. Les parties de très forte basophilie se colorent en violacé sur un cytoplasme rose.

Résultats. — Cette technique nous a permis de mettre en évidence, dans les formes granulaires typiques les plus basophiles, des zones de très haute basophilie et de morphologie assez caractéristique.

Ces zones sont organisées en spirales nettes, comme le montrent les dessins relevés d'après les préparations obtenues et les photographies. Ces résultats sont voisins de ceux obtenus chez les bactéries (fig. 29).

Là aussi, on a plusieurs noyaux disposés en spirales. Mais cela semble normal puisque nos éléments sont absolument ronds.

Les formes vésiculaires sont de grosseurs variables. Ordinairement, les plus grosses contiennent une calotte granulaire à un pôle. On ne les retrouve jamais intègres sur les lames. La membrane, extrêmement fine, est fragile. La partie cytoplasmique est moins basophile que dans le cas des granules denses, et les noyaux apparaissent sans hydrolyse enzymatique.

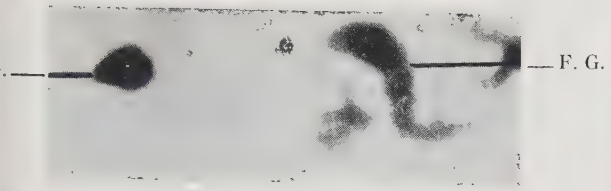
L'action de la ribonucléase fait disparaître la basophilie cytoplasmique et il faut surcolorer à la fuchsine pour les différencier des artefacts.

La présence de ces calottes granulaires peut s'expliquer par deux hypothèses :

— *Ou* il existe un pôle cytoplasmique ayant des forces de croissance repoussant les noyaux, connues dans le cas des bactéries,

— *Ou,* ce qui est moins plausible, il s'agirait d'une « décantation nucléaire » (les vésicules sont immobiles, même dans les micro-colonies) juste avant la transformation en formes germinatives.

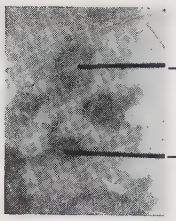
Pour les formes germinatives, on a pu, dans quelques-unes (nous pensons que ce sont les plus jeunes), mettre aussi en valeur ces zones basophiles spiralées (voir schéma de la fig. 29). Mais la plupart sont assez sensibles à l'action de la ribonucléase, même après des temps d'action courts,



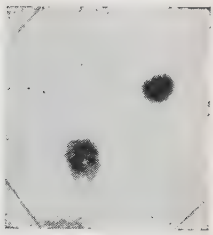
ranule (G.) dense.

Forme germinative (F. G.) jeune.

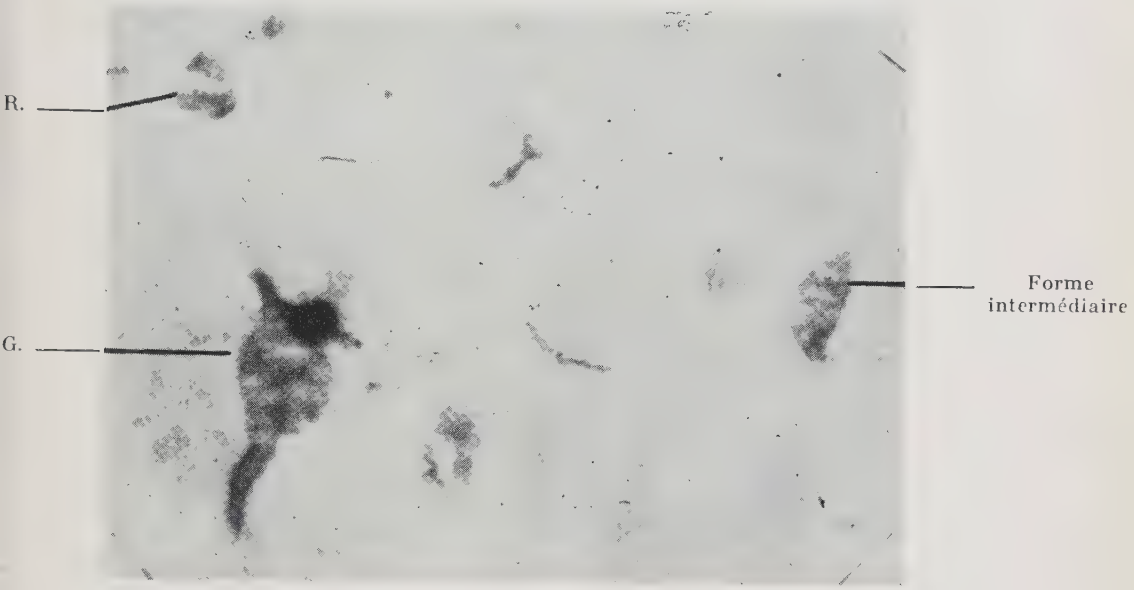
Grossissement : 10.000.



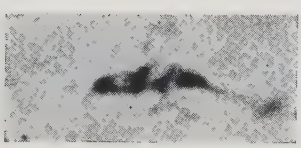
Vésicule granulaire (V. G.) et forme germinative (F. G.)



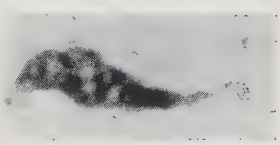
Granules.



Formes germinatives et formes rondes.



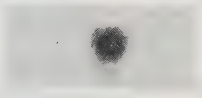
Jeune forme germinative.



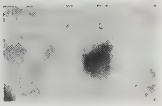
Forme germinative.

FIG. 28.

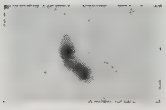
Formes atypiques d'une culture jeune.
Coloration au bleu de toluidine phéniqué. R. A. L.



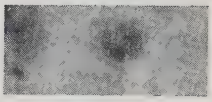
Forme granulaire avec anneau nucléaire.



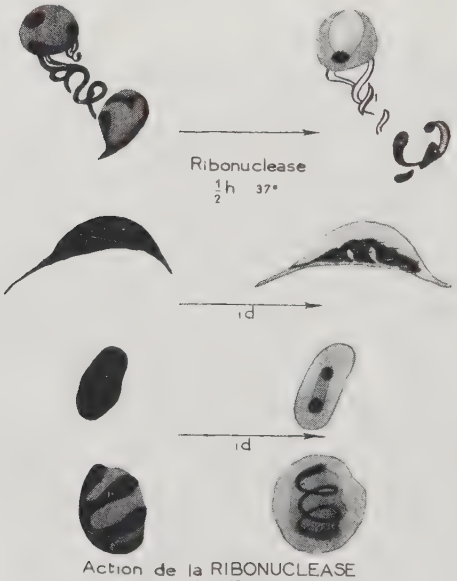
Forme granulaire avec anneau nucléaire.



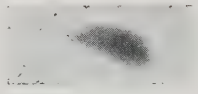
Granule avec noyau en spirale.



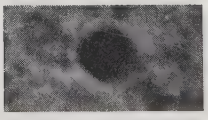
Granule à deux noyaux.



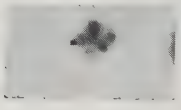
Action de la RIBONUCLEASE 10mg/50cc sur quelques formes granulaires



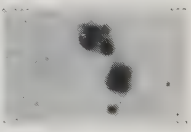
Photographie d'un gros granule avec noyau en torsade (correspondant au schéma ci-contre).



Granule polynucléé.



Granule à quatre noyaux.



Granule à trois ou quatre noyaux.

FIG. 29.

Formes atypiques après action de la ribonucléase.

Quant aux formes spiralées, elles disparaissent rapidement et, le plus souvent, on ne les distingue qu'après surcoloration au Zielh dilué.

Nous avons mis en évidence un appareil très probablement nucléaire, dans le cas des formes granulaires de 1 à 3 μ. Au delà de ce stade très précoce, nous n'avons pu mettre en évidence un noyau, en procédant selon notre technique.

Les images rencontrées avant et après ribonucléase nous font d'ailleurs penser que le temps pendant lequel le noyau est apparent, est très court. Et l'on comprend pourquoi, avec des développements rapides, seul le microscope à contraste de phase permet l'observation nette de ces granules. La concentration des frottis, en formes à noyaux inapparents, ne permet pas d'images nettes.

D'autres techniques devront, de plus, être employées, notamment :

— La technique à la désoxyribonucléase,

— Le Feulgen, après hydrolyse enzymatique ou chlorhydrique.

Conclusion

Cependant, même si cette étude est courte, elle est utile car elle précise bien un phénomène dont nous cherchons la signification et sur lequel nous nous sommes perpétuellement heurté tout au long de ce travail : le phénomène granulaire.

Cette forme de passage nous paraît assez identique aux formes décrites par Tulasne et Minck [61], puis par Tulasne et Vendrely [63].

Loin de signifier un processus involutif, elle caractérise un phénomène évolutif de grande valeur biologique qui, en attendant des résultats expérimentaux plus nombreux, pourrait se schématiser de la façon suivante :

Un spirochète placé dans un milieu *neuf* ou *nouveau* se

condense en une granule avec, comme stade intermédiaire, le « spirochète granuleux ». Cette granule se gonfle en formant une vésicule granulaire dont le noyau serait apparent au microscope à contraste de phase. Par division nucléaire, sans division cytoplasmique, on obtient une vésicule polynucléée (les noyaux pouvant se rassembler à un pôle et former ainsi une calotte granulaire).

Les noyaux s'allongent ensuite et s'orientent en spires. Ce sont les très jeunes formes germinatives. Les spirochètes s'individualisent ensuite, probablement dans ces expansions caractéristiques des formes germinatives et suivant un processus que nous ignorons. Les spirochètes ainsi formés se répandent dans le milieu et se multiplient activement par division transversale.

Après une courte phase « maximale », la morphologie se modifie une nouvelle fois avec formation de spirochètes granuleux, ou « granules spirochétogènes » de Manouellan, puis formation de formes « annulaires » et, enfin, de « formes rondes » (« Round Body » de Rose Morton).

Si on ne repique pas la culture, ces formes ne peuvent évoluer en formes germinatives et spirochètes.

On comprend mieux, désormais, beaucoup de problèmes envisagés antérieurement, car la vitesse de développement est, finalement, *l'expression de la vitesse de ce cycle* qui apparaîtra d'autant plus nettement que les transformations décrites seront plus lentes. Ainsi, la température agit sur la vitesse, c'est-à-dire sur les réactions métaboliques que nécessite, dans toutes les cultures, la synthèse nucléique, comme le montrent Tulasne et Hinck [61].

La dilution de l'inoculum diminue également cette vitesse, puisque l'on a peu d'organisme pour faire évoluer le milieu. Et si les réducteurs ont une action plus complexe, il n'en reste pas moins qu'ils doivent influencer les réactions métaboliques du premier stade et, finalement, le cycle biologique du spirochète.

En étudiant les potentiels de culture sur les V. F. conte-

nant différentes concentrations d'acide thioglycollique, nous avons vu que la chute de potentiel initiale est due au phénomène granulaire qui est assez général, même pour des bacilles à développement lent, comme le bacille de Koch.

Aussi, peut-on penser que cette chute active et intense est liée à l'anabolisme des acides ribonucléiques et des acides désoxyribonucléiques.

Si l'on compare l'intensité de la chute du potentiel et le nombre de formes élaborées en un temps défini, on peut penser de cette synthèse :

— *Soit* qu'elle réclame une énergie importante, que le micro-organisme prélève sur le milieu en catabolisant un grand nombre de matériaux et en saturant les accepteurs d'hydrogène du milieu,

— *Soit* que, connaissant la structure des acides nucléiques (noyaux purimidique et purique) fortement déshydrogénée, cette synthèse nécessiterait un transport des hydrogènes sur le milieu (à condition évidemment que l'organisme fasse ses synthèses avec des matériaux divers).

L'étude des « potentialités » elle-même devient désormais un faux problème.

En effet, au cours de nos numérations, nous comptons des formes représentant des stades différents ayant finalement une même signification, mais contenant un nombre variable de noyaux ou, si l'on peut dire, d'éléments préfabriqués.

Là encore, le problème est, avant tout, cytochimique.

Pour comparer de façon exacte des inoculats, il faudrait déterminer non pas le nombre de formes respectives, mais surtout le nombre de noyaux que l'on inocule, chose difficile à réaliser étant donné les erreurs de numération (il faudrait déterminer le pourcentage des éléments à 1, 2, 3, 4 noyaux, etc., et, pendant ce temps, la souche aurait déjà varié !).

Nous pensons d'ailleurs que, là encore, les formes granu-

laires initiales, en général, auraient une vitesse de croissance plus rapide, car la forme spiralée inoculée, à concentration nucléaire égale, aurait à effectuer son stade granulaire avant la phase d'expansion.

Quant aux formes granulaires finales, formes qui ont vécu dans des conditions plus difficiles, qui sont déjà dégradées plus ou moins fortement, il est possible que leur potentialité passe au dernier plan.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Cette étude traite plusieurs aspects du problème de la biologie de *Treponema pallidum* souche Reiter.

Nous avons surtout cherché à mettre en valeur un phénomène qui existe toujours au début des cultures de ce spirochète : le phénomène granulaire.

Il nous a semblé d'une grande importance biologique. Il caractérise, sans doute, l'adaptation plus ou moins grande de ces micro-organismes à nos milieux.

Mais surtout, c'est lui qui répond particulièrement aux divers agents permettant d'influencer le développement des cultures.

C'est lui qui engendre les variations de potentiels les plus spécifiques et les plus intenses, la phase d'expansion ayant une répercussion plus discrète sur cette valeur physique.

C'est lui qui offre la plus grande potentialité au repiquage, d'où certains paradoxes rencontrés au cours de cette étude. Là encore, il faut remarquer la discrétion spirochétienne.

Enfin, l'étude cytochimique et la mise en valeur des structures nucléaires permettent, nous semble-t-il, de faire une synthèse des observations antérieures et, surtout, d'introduire le cycle spirochétien dans l'ensemble des cycles de micro-organismes.

Pour eux, variation du milieu et élaboration de formes (c'est-à-dire, au fond, construction de matériaux chimiques) sont toujours liées, et si le nombre des processus

métaboliques est réduit, les variantes sont nombreuses, d'où la nécessité de ne négliger aucun facteur physique, chimique ou morphologique.

Ces processus paraissent très généraux chez les bactéries, comme l'ont montré Boivin, Vendrely et Tulasne, et on pourrait y adjoindre les spirochètes.

Finalement, alors que la plupart des auteurs considèrent les formes granulaires, prises dans leur totalité, comme l'expression d'une « involution », d'une « souffrance », d'une « résistance » des spirochètes vis-à-vis d'un milieu, il nous a paru, au contraire, qu'elles étaient l'expression d'un vrai cycle évolutif dont nous avons cherché l'importance, la signification et la variabilité.

Cela nous permet d'intégrer l'étude du spirochète de Reiter et, probablement, de tous les spirochètes, à la physiologie et à la biologie classiques des êtres unicellulaires en considérant que les phases sont sinon exactement identiques, du moins similaires et, surtout, représentent les mêmes mécanismes fondamentaux.

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

LE TEST DE NELSON.
SON INTERPRÉTATION.

Vu :
Le Doyen,
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
R. PAUTRIZEL.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 20 Juillet 1956
Le Recteur,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Babudieri. — *R. C. Ist. sup. Sanita,* 1946, **17,** 966.
2. Babudieri. — *R. C. Ist. sup. Sanita,* 1952, **15,** 711.
3. Blanquet (P.) & Arnaud (Y). — *Bull. du Cancer* (à paraître).
4. Blanquet (P.), Quéré (J.) & Arnaud (Y.). — *Bull. du Cancer,* 1954, **41,** 46.
5. Boivin (A.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris),* 1948, **142,** 1258.
6. Boivin (A.) & Vendrely (R.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris),* 1943, **137,** 432.
7. Brachet. — *C. R. Soc. Biol. (Paris),* 1940, **135,** 88.
8. Bucca (M. A.) & Tager (J. D.). — *J. vener. Dis. Inform.,* 1951, **32,** 6.
9. Carpeni. — Technique de Laboratoire, 1. Masson & C^ie^, édit., Paris, 1954.
10. Caspersson (T. O.). — *Nord med. Ark.,* 1945, **28,** 2636.

10 bis. Caspersson (T. O.). — Congrès Int. Gyn. et Obst. Georg, édit., Genève, 1954.

11. Corbe. — Les *p*H et *r*H^2 des eaux minérales de Vichy. Wallon, édit., 1947.
12. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *Amer. J. Syph.,* 1950, **34,** 122.
13. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *Amer. J. Syph.,* 1950, **34,** 515.
14. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *J. exp. Med.,* 1950, **92,** 239.
15. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *J. exp. Med.,* 1950, **92,** 247.
16. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *Amer. J. Syph.,* 1951, **35,** 164.
17. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *Amer. J. Syph.,* 1951, **35,** 180.
18. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *Amer. J. Syph.,* 1951, **35,** 216.
19. Delamater (E. D.), Haanes (M.) & Wiggall (R. H.). — *J. invest. Derm.,* 1951, **16,** 231.
20. Delamater (E. D.). — *Stain. Techn.,* 1951, **26,** 199.

21. Eagle (H.). — *J. exp. Med.*, 1940, **71,** 215.
22. Eagle (H.) & Germuth (F. G.). — *J. Immunol.*, 1948, **60,** 223.
23. Eagle (H.) & Steinman (H. G.). — *J. Bact.*, 1948, **56,** 163.
24. Eagle (H.) & Steinman (H. G.). — *J. Bact.*, 1950, **60,** 57.
25. Eagle (H.) & Steinman (H. G.). — *J. Bact.*, 1952, **64,** 265.
26. Eagle (H.) & Steinman (H. G.). — *J. Biol. chem.*, 1953, **200,** 775.
27. Eagle (H.) & Steinman (H. G.). — *J. Bact.*, 1953, **65.**
28. Gaethgens. — *Arch. Derm. Syph. (Berl.)*, 1938, **42,** 46.
29. Gelperin (A.). — *Amer. J. Syph.*, 1949, **33,** 101.
30. Hewitt (L. F.). — Oxydation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry. Livingstone, édit., London, 1950.
31. Koch, cité par Eagle (H.). — *J. exp. Med.*, 1940, **71,** 215.
32. Krzystalowicz (Fr.). — *Bull. Acad. Sc. Cracovie*, 1905, **9,** 713.
33. Lépine (P.). — *Presse Méd.*, 1931, **66,** 1233.
34. Lépine (P.). — *Rev. de Méd.*, 1931, **48,** 721.
35. Levaditi (C.) & Schoen (R.). — *Bull. Acad. Méd. (Paris)*, 1927, **88,** 149.
36. Manouelian (Y.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55,** 698.
37. Manouelian (Y.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **200,** 2122.
38. Manouelian (Y.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64,** 439.
39. Marchoux (E.) & Chorine (V.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1930, **104,** 259.
40. Marchoux (E.) & Chorine (V.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1933, **112,** 945.
41. Marchoux (E.) & Chorine (V.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1933, **113,** 1417.
42. Minck (R.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1948, **142,** 246.
43. Minck (R.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1948, **142,** 531.
44. Mollinedo y Herrera. — Thèse de Sciences, Paris, 1941.
45. Moureau (H.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90,** 728.
46. Muster (I.). — *Dermatologica (Basel)*, 1942, **86,** 351.
47. Noguschi (H.). — *J. ann. med. Amer.*, 1912, **58,** 1163.
48. Pascal (P.). — Chimie Générale, **2.** Masson & C^ie^, édit., Paris, 1951.
49. Plotz (M.) & Geloso (J.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1930, **104,** 1211.
50. Piffault (C.), Blanquet (P.), Quéré (J.) & Arnaud (Y.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1954, **92,** 61.
51. Prowazeck (S. von). — *Arb. Gesundh. Amte (Berl.)*, 1907, **26,** 23.
52. Rose (N. R.). — *Amer. J. Syph.*, 1951, **35,** 503.
53. Rose (N. R.) & Morton (H. E.). — *Amer. J. Syph.*, 1952, **36,** 17.
54. Rose (N. R.) & Morton (H. E.). — *Amer. J. Syph.*, 1952, **36,** 1.

55. Schaudinn (F.) & Hoffmann (E.). — *Dtsch. med. Wchr.*, 1905, **18,** 711.
56. Schaudinn (F.) & Hoffmann (E.). — *Dtsch. med. Wchr.*, 1905, **42,** 1665.
57. Seguin (P.). — *Ann. Derm. Syph. (Paris)*, 1939, **10,** 833.
58. Sterzl (J.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1948, **142,** 1053.
59. Tulasne (R.). — *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1951, **14,** 623.
60. Tulasne (R.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1949, **143,** 1390.
61. Tulasne (R.), Minck (R.) & Minck (A.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1948, **142,** 1014.
62. Tulasne (R.) & Minck (R.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1947, **141,** 1255.
63. Tulasne (R.) & Vendrely (R.). — *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1954, **17,** 649.
64. Whiteley (H. R.) & Frasier (C. N.). — *Amer. J. Syph.*, 1943, **32,** 43.
65. Wurmser. — Oxydations-Réductions. Presses Universitaires, 1930.
66. Wurmser & Geloso (J.). — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1930, **104,** 135.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

PRÉFACE 1

INTRODUCTION 5

PREMIÈRE PARTIE. — HISTORIQUE DES TRAVAUX 7

Treponema pallidum 7
Tréponème pâle en culture 9
Morphologie du *Treponema pallidum* souche Reiter 10

DEUXIÈME PARTIE. — TRAVAUX PERSONNELS 17

Introduction 17

I. — Moyens d'analyse 18

A. — Microscopie 18

B. — Coloration 20

C. — Numération 23

II. — Développement et formes 25

A. — Premiers repiquages 26

B. — Description du développement « normal » sur milieu Brewer 29

C. — Développement dirigé 42

D. — Discussion 52

III. — Variations physico-chimiques et formes 53

A. — Application des mesures potentiométriques en biologie 54

B. — Matériel et méthode 60

C. — Résultats 66

Pages

IV. — Valeur ou potentialité biologique des formes spiralées ou atypiques 76

A. — Matériel spirochétien 77

B. — Souillure des milieux 80

V. — Analyse cytochimique des formes 83

Conclusion 91

Conclusions générales 95

Bibliographie 97

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.